

SERGIO LUNARDON PADILHA

**CORRELAÇÃO DO QUIMERISMO E DA REJEIÇÃO COM  
AS VARIÁVEIS RELACIONADAS AO TRANSPLANTE DE  
MEDULA ÓSSEA ALOGÊNICO NA  
ANEMIA APLÁSTICA SEVERA**

Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre. Curso de  
Pós-Graduação em Medicina Interna,  
Setor de Ciências da Saúde, Universidade  
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pasquini

CURITIBA

2001



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Paraná  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna  
= Mestrado e Doutorado =

---

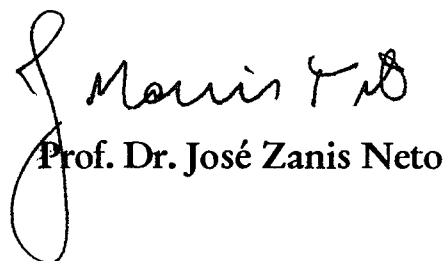
## PARECER

**PARECER CONJUNTO** dos Professores Dr. Roberto Passeto Falcão, Dr. José Zanis Neto e Dr. Ricardo Pasquini sobre a Dissertação de Mestrado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborada por Sérgio Lunardon Padilha, intitulada: **“CORRELAÇÃO DO QUIMERISMO E DA REJEIÇÃO COM AS VARIÁVEIS RELACIONADAS AO TRANPLANTE DE MEDULA ÓSSEA ALOGÊNICO NA ANEMIA APLÁSTICA SEVERA”**.

A Banca Examinadora considerou que Sérgio Lunardon Padilha apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe: Conceito "A", correspondente ao Grau "A", sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de MESTRE EM MEDICINA e a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 10 de outubro de 2.001.

  
Prof. Dr Roberto Passeto Falcão

  
Prof. Dr. José Zanis Neto

  
Prof. Dr. Ricardo Pasquini

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, que me deu formação pessoal e o apoio necessário para continuar meu trabalho profissional.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pasquini, que sempre incentivou a prática da pesquisa e sua incansável luta pelo ensino médico na Universidade Federal do Paraná.

Ao prof. Dr. Rogério Andrade Mulinari, pelo grande apoio como coordenador do Mestrado em Medicina Interna da UFPr e sempre incentivando à pesquisa científica.

Aos colegas de trabalho e funcionários do Hospital de Clínicas que foram de vital importância para um bom desempenho profissional.

Aos professores que me ajudaram no aprendizado e execução desta dissertação.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 GENERALIDADES.....	1
1.2 HISTÓRICO.....	1
1.3 ASPECTOS CLÍNICOS.....	2
1.3.1 INCIDÊNCIA.....	2
1.3.2 ETIOLOGIA.....	3
1.3.3 DIAGNÓSTICO.....	3
1.4 FISIOPATOLOGIA.....	3
1.5 TRATAMENTO DA ANEMIA APLÁSTICA.....	6
1.5.1 INTRODUÇÃO.....	6
1.5.2 TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA.....	6
1.5.2.1 RESULTADOS.....	7
1.5.3 IMUNOSSUPRESSÃO.....	9
1.5.3.1 CORTICOSTERÓIDES.....	9
1.5.3.2 GLOBULINAS ANTI-LINFCÍTICAS.....	10
1.5.3.3 CICLOSPORINA A .....	10
1.5.3.4 IMUNOSSUPRESSÃO COMBINADA.....	11

1.5.4 COMPARAÇÃO ENTRE O TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA E A IMUNOSSUPRESSÃO.....	12
1.5.5 OUTRAS ABORDAGENS.....	13
1.6 QUIMERISMO.....	14
1.6.1 DEFINIÇÃO.....	14
1.6.2 TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO.....	14
1.6.3 CORRELAÇÃO CLÍNICA.....	16
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	20
3.2 CARACTERÍSTICAS DO TRANSPLANTE.....	22
3.2.1 CONDICIONAMENTO.....	25
3.2.2 ANÁLISE DO QUIMERISMO.....	26
3.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4. RESULTADOS.....	24
4.1 QUIMERISMO.....	28
4.1.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E O QUIMERISMO.....	28
4.1.2 QUIMERISMO E CICLOFOSFAMIDA ISOLADA .....	30
4.1.3 QUIMERISMO E CICLOFOSFAMIDA + BUSSULFANO.....	31
4.2 REJEIÇÃO.....	32
4.2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E A REJEIÇÃO.....	32
4.2.2 REJEIÇÃO E CICLOFOSFAMIDA ISOLADA.....	34
4.2.3 REJEIÇÃO E CICLOFOSFAMIDA + BUSSULFANO.....	35
5. DISCUSSÃO.....	37

6. CONCLUSÕES.....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - IMUNOSSUPRESSÃO INTENSA NA AAS.....	12
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS .....	21
TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO EM ESTUDO E A TOTALIDADE DE PACIENTES TRANSPLANTADOS POR AAS NO MESMO PERÍODO.....	25
TABELA 4 - CONDICIONAMENTO E VARIÁVEIS PRÉ-TRANSPLANTE.....	26
TABELA 5 - CORRELAÇÃO ENTRE O QUIMERISMO E AS COVARIÁVEIS.....	29
TABELA 6 - ANÁLISE MULTIVARIADA DO QUIMERISMO.....	29
TABELA 7 - CORRELAÇÃO ENTRE O QUIMERISMO E AS COVARIÁVEIS NO GRUPO DA CICLOFOSFAMIDA ISOLADA.....	31
TABELA 8 - CORRELAÇÃO ENTRE O QUIMERISMO E AS COVARIÁVEIS NO GRUPO DA CICLOFOSFAMIDA ASSOCIADA AO BUSSULFANO .....	32
TABELA 9 - CORRELAÇÃO ENTRE A REJEIÇÃO E AS COVARIÁVEIS.....	33
TABELA 10 - ANÁLISE MULTIVARIADA DA REJEIÇÃO.....	33
TABELA 11 - VARIÁVEIS INDEPENDENTES À REJEIÇÃO.....	34
TABELA 12 - CORRELAÇÃO ENTRE A REJEIÇÃO E AS COVARIÁVEIS NO GRUPO DA CICLOFOSFAMIDA ISOLADA .....	35
TABELA 13 - CORRELAÇÃO ENTRE A REJEIÇÃO E AS COVARIÁVEIS NO GRUPO DA CICLOFOSFAMIDA ASSOCIADA AO BUSSULFANO .....	35
TABELA 14 - ANÁLISE MULTIVARIADA DA REJEIÇÃO NO GRUPO DA CICLOFOSFAMIDA ASSOCIADA AO BUSSULFANO.....	36

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1 -</b>	<b>CORRELAÇÃO ENTRE O QUIMERISMO E O CONDICIONAMENTO.....</b>	<b>30</b>
-------------------	---	-----------



## LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Anemia aplástica  
AAS – Anemia aplástica severa  
BU - Bussulfano  
CFA – Ciclofosfamida  
CSA – Ciclosporina A  
DECH – Doença do enxerto contra hospedeiro  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
EGBMT – European group for bone marrow transplantation  
FISH – Fluorescence in situ hybridization  
GAL – Globulina anti-linfocítica  
GAT – Globulina anti-timocítica  
HLA – Antígeno de histocompatibilidade  
HPN – Hemoglobinúria paroxística noturna  
IBMTR – International bone marrow transplantation registry  
IS – Imunossupressão  
MO – Medula óssea  
MTX – Metotrexato  
PCR – Polymerase chain reaction  
TMO – Transplante de medula óssea  
VNTR – Variable number of tandem repeats

## RESUMO

O estudo teve por objetivo determinar a interação entre os fatores clínicos no pré- e pós transplante de medula óssea alogênico em portadores de anemia aplástica severa com a ocorrência do quimerismo e da rejeição. O estudo abrangeu 111 de 291 pacientes com anemia aplástica severa e submetidos ao transplante de medula óssea alogênico aparentado. Os critérios de inclusão identificaram 65 pacientes condicionados com ciclofosfamida isolada na dose de 200 mg/kg e 46 pacientes na associação de ciclofosfamida 120 mg/kg com o bussulfano 12 mg/kg. Os métodos de avaliação do quimerismo incluíram a citogenética em 65 (58,6%) dos pacientes e pela VNTR em 46 (41,4%). Encontrou-se um percentual de 75,3% de quimerismo misto no grupo da ciclofosfamida isolada e de 54,3% no grupo associado ao bussulfano com um valor p de 0,02. As covariáveis relacionadas ao quimerismo analisadas foram: idade, sexo, número de transfusões pré-transplante, etiologia da anemia aplástica, duração da doença pré-transplante, número de neutrófilos pré-transplante, condicionamento, número de células infundidas, tempo para atingir >500 neutrófilos/ $\mu$ L tempo para atingir >50.000 plaquetas/ $\mu$ L, tempo para atingir >100.000 plaquetas/ $\mu$ L, DECH aguda e DECH crônica. Houve diferença significativa apenas para o condicionamento empregado para a ciclofosfamida isolada e na associação com o bussulfano através da análise multivariada com  $p < 0,0001$ . As covariáveis relacionadas com a rejeição incluíram o quimerismo e as mencionadas anteriormente. O quimerismo foi a única variável independente significativa para a rejeição pela análise multivariada com valor  $p < 0,0001$ . A ocorrência de quimerismo misto nos pacientes submetidos ao TMO alogênico foi mais frequente nos pacientes condicionados com ciclofosfamida isolada quando comparado à associação de ciclofosfamida e bussulfano. A ocorrência de rejeição foi inversamente proporcional ao quimerismo.

## SUMMARY

The objective of this study was to determine the interaction between the clinical factors in the pre- and post- allogeneic bone marrow transplantation (AlloBMT) in patients with severe aplastic anemia comparing the occurrence of chimerism and rejection. The study included 111 of 291 patients with severe aplastic anemia, submitted to AlloBMT. Inclusion criteria identified 65 patients conditioned with cyclophosphamide dose of 200 mg/kg and 46 patients with the association of cyclophosphamide 120 mg/kg and busulfan 12 mg/kg. Chimerism was evaluated by cytogenetics in 65 (58,6%) patients and for VNTR in 46 (41,4%) patients. Mixed chimerism was found in 75,3% in the cyclophosphamide group and 54,3% in association with busulfan group,  $p = 0,02$ . The covariables related to the chimerism analyzed were: age, sex, number of pre-transplant transfusions, aplastic anemia's etiology, duration of the disease pre-transplant, number of pre-transplant neutrophils, conditioning, number of infused cells, time to reach  $>500$  neutrophils/ $\mu\text{L}$ , time to reach  $>50.000$  platelets/ $\mu\text{L}$ , time to reach  $>100.000$  platelets/ $\mu\text{L}$ , acute GVHD and chronic GVHD. Conditioning was the sole significant variable related to chimerism through multivariate analysis,  $p$  value  $<0,0001$ . Chimerism was a significant independent variable for rejection through multivariate analysis,  $p < 0,0001$ . The occurrence of mixed chimerism in AlloBMT patients happened more frequently in cyclophosphamide conditioning when compared to the cyclophosphamide associated with busulfan. Occurrence of rejection was more frequent in patients with less percentage of chimerism.

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 GENERALIDADES**

A anemia aplástica severa (AAS) é uma doença que vem despertando o interesse dos pesquisadores desde o século passado. Caracteriza-se por uma diminuição de todas as séries no sangue periférico, uma medula óssea vazia, substituída por gordura e que não contenha células estranhas ou alterações nos cromossomos. Pessoas de todas as idades podem ser acometidas, com elevado risco de vida. Este risco está diretamente relacionado com o grau de redução do número das células do sangue periférico.

A compreensão dos mecanismos biológicos da insuficiência medular, a melhoria nos cuidados de suporte e procedimentos com níveis elevados de complexidade técnica vêm contribuindo para o alcance de resultados altamente efetivos para a maioria dos pacientes. O uso de drogas que agem no sistema imune e o transplante de medula óssea (TMO) alteram o curso natural da doença. No final da década de 60, o TMO tornou-se o tratamento de escolha para a anemia aplástica severa.

## **1.2 HISTÓRICO**

O estudo sobre a falência da medula óssea é tradicionalmente datado de 1888, quando Paul Ehrlich descreveu uma mulher jovem que morreu após uma doença grave e de evolução rápida. A doença foi evidenciada por uma anemia severa, sangramento na pele, na retina e com febre alta. Como patologista, Ehrlich notou a ausência de células vermelhas nucleadas e a alteração na qualidade da gordura da medula óssea femoral. Tais achados eram

opostos a uma resposta fisiológica da anemia, inferindo sobre a morfologia e o mecanismo da falha da regeneração das células vermelhas.<sup>1</sup> A combinação de baixo número das células no sangue periférico e ausência de precursores na medula óssea, mantém-se como um achado essencial para o diagnóstico da anemia aplástica.

Em 1934, apesar de não estar claramente definida, a anemia aplástica foi descrita como uma entidade clínica distinta, caracterizada por pancitopenia, resultante de uma depressão da atividade da medula óssea. No início dos anos 50, o termo foi restrito a casos em que não havia evidências de doença primária capaz de produzir uma supressão medular.<sup>2</sup>

### **1.3 ASPECTOS CLÍNICOS**

#### **1.3.1 INCIDÊNCIA**

A AAS é uma doença com incidência de 2 a 6 casos por milhão de habitantes da população, porém não representa bem a realidade e está influenciada por dois fatores: o método de definição da doença e critérios de exclusão do diagnóstico. A literatura mostrou uma grande variação destas informações. Apenas dois dos trabalhos realizados foram prospectivos e a incidência se revelou mais baixa do que os retrospectivos.<sup>1</sup>

Um estudo realizado na Tailândia, iniciado em 1989 e concluído em 1993, mostrou uma incidência de 3,7 casos por milhão de habitantes para a anemia aplástica, com uma ocorrência maior para os grupos com menor grau de educação e naqueles com uma pior condição socioeconômica.<sup>3</sup> Outro estudo na cidade de Curitiba evidenciou uma incidência anual de 2 casos por milhão de habitantes e no Estado do Paraná 2,4 casos por milhão de habitantes.<sup>4</sup>

### 1.3.2 ETIOLOGIA

As anemias aplásticas compreendem um grupo heterogêneo de doenças, tendo como causas: agentes físicos, químicos e agentes virais resultantes da agressão direta ou mediadas por mecanismo imune. Em um estudo prospectivo, multicêntrico, realizado na França, 74% dos pacientes foram considerados como idiopática, 13% associados a drogas e 5% relacionados com hepatite.<sup>2</sup> No oriente a hepatite documentada variou entre 4 a 10%.<sup>5</sup> O uso de pesticida doméstico do grupo misto, associado a organofosforado apresentou-se como fator de risco no estudo em Curitiba.<sup>4</sup>

### 1.3.3 DIAGNÓSTICO

Há uma correlação bem definida entre a celularidade do aspirado e da biópsia da medula óssea (MO).<sup>6</sup> Entretanto, há situações onde há diluição com sangue sinusoidal tornando-o erroneamente hipocelular em relação à biópsia da MO.<sup>7</sup> Os pacientes com pancitopenia devem ser cuidadosamente acompanhados por períodos longos, pois o diagnóstico inicial pode ser bastante difícil.<sup>8</sup>

Nos estados de pancitopenia, a sobrevida relaciona-se mais à contagem das células do sangue periférico que à celularidade da MO. Os fatores prognósticos individuais mais importantes foram: infecção severa no momento do diagnóstico, contagem de granulócitos  $<500/\text{mm}^3$  de sangue, contagem das plaquetas  $<30.000/\text{mm}^3$  de sangue, percentual de células não-mielóides na MO e finalmente a contagem reduzida de reticulócitos.<sup>9</sup>

### 1.4 FISIOPATOLOGIA

Na maioria dos pacientes, a AAS é o resultado da insuficiência medular, ocorrendo uma destruição específica do tecido orgânico, mediada pelo sistema imune. O curso da doença

pode ser separado em duas fases distintas: inicialmente a exposição de um antígeno estimulador e posteriormente resultado da ação das células e citocinas do sistema imunológico. Estas agem destruindo as células-tronco da MO, reduzindo o seu número. Não conseguem manter os níveis de produção dos leucócitos, dos eritrócitos e das plaquetas.<sup>10</sup>

A hematopoese está muito diminuída na anemia aplástica, com deficiência profunda das células progenitoras.<sup>11</sup> Estas células exprimem a adesividade celular protéica chamada de CD34<sup>+</sup> de acordo com a citometria de fluxo e o número das células CD34<sup>+</sup> positivas está muito reduzido na AAS.<sup>12-14</sup> Os progenitores hematopoéticos maduros podem ser quantificados por testes funcionais e estão virtualmente ausentes.<sup>15</sup>

A fisiopatologia da AAS envolve vários mecanismos incluindo-se: o defeito na proliferação intrínseca dos precursores das células hematopoéticas; reação imunológica contra as células precursoras hematopoéticas; o envolvimento concomitante de células do ambiente não hematopoético no processo de doença e disposição genética.<sup>16</sup>

A sobrevivência e a proliferação das células hematopoéticas dependem das células do estroma, as quais fornecem fatores de crescimento, essenciais à viabilidade, proliferação e diferenciação das células-tronco.<sup>17</sup> A participação da interleucina 3, interleucina 6 e fatores de crescimento também contribui neste processo.<sup>18</sup>

Há evidência clínica e experimental de um defeito persistente na capacidade de proliferação hematopoética na anemia aplástica. Os pacientes tratados com imunossupressão apresentam células progenitoras no sangue periférico, principalmente após o uso de fator estimulante de colônias de granulócitos, alcançando um nível de reconstituição semelhante aos dos pacientes que se submeteram ao TMO.<sup>19</sup> Entretanto, as células progenitoras estão diminuídas e raramente alcançam uma recuperação completa.<sup>16, 20-22</sup>

Certos agentes químicos e físicos agem diretamente na célula, lesando tanto as células hematopoéticas em proliferação, quanto as que estão em repouso, levando a um dano ao DNA, e finalmente à apoptose.<sup>23</sup>

Observou-se uma melhora dos pacientes que receberam soro anti-linfocítico, sugerindo que o regime imunossupressor promove uma pega da medula do doador e muitas vezes pode estimular a função medular do hospedeiro.<sup>24</sup> O retorno à produção das células sanguíneas pela medula do próprio paciente ocorre após a administração de um regime imunossupressor intenso. Este fato corrobora o envolvimento de uma doença imune como etiologia da anemia aplástica.<sup>25</sup>

Tais observações deram início a ensaios clínicos utilizando imunossupressores para o tratamento da anemia aplástica. Esses estudos iniciaram-se na Europa com a utilização da gamaglobulina anti-linfocítica (GAL),<sup>26</sup> posteriormente a globulina anti-timocítica (GAT) nos Estados Unidos,<sup>27</sup> e ainda altas doses de metilprednisolona,<sup>28</sup> ciclosporina A (CSA)<sup>29</sup> e ciclofosfamida sem TMO.<sup>30</sup> Foram alcançados índices de sucesso de 70 a 80%, definidos como a ausência da necessidade de transfusão e o número de neutrófilos adequado para prevenir infecções.<sup>31</sup> Estas proporções têm se igualado ao TMO,<sup>32</sup> reduzindo o número de linfócitos ou bloqueando a função das células T, principalmente na associação de drogas imunossupressoras.<sup>10</sup>

Através de experimentos em cultura de medula óssea com depleção de células T, tornou-se claro que os linfócitos T, particularmente o fenótipo CD8+, estavam envolvidos na fisiopatologia da AA.<sup>33,34</sup> Há uma ativação das células T pelo aumento na produção de interferon,<sup>35</sup> linfocinas e o fator de necrose tumoral alfa.<sup>36,37</sup> Houve uma forte correlação entre a resposta à imunossupressão com os níveis da produção do interferon gama<sup>38-40</sup> e o número de linfócitos ativados.<sup>41</sup>



Uma complicação importante e ainda não explicada do curso clínico da AA é o desenvolvimento de doenças hematológicas clonais tardias. Após dez anos de sucesso da terapia imunossupressiva, a hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) ocorreu em 9% dos pacientes;<sup>42</sup> a mielodisplasia e a leucose mielóide aguda acumularam 16% em dez anos de tratamento.<sup>43</sup>

## **1.5 TRATAMENTO DA ANEMIA APLÁSTICA**

### **1.5.1 INTRODUÇÃO**

A fisiopatologia da doença sugere duas abordagens para o tratamento: a reposição das células-tronco hematopoéticas e a reconstituição do sistema imunológico pelo TMO ou pela supressão do processo destrutivo imune.<sup>16</sup>

Nos pacientes com um doador HLA (antígeno de histocompatibilidade) idêntico, compatível e com menos de 50 anos, o transplante alogênico deve ser a terapia inicial, oferecendo uma chance de 75 a 90% de sobrevida prolongada, com normalização do sangue periférico e da celularidade na MO. Os pacientes restantes devem receber terapia imunossupressiva com globulina anti-linfocítica e ciclosporina A, com uma resposta de 60 a 80%. Altas doses de ciclofosfamida, sem transplante de medula óssea, podem ser capazes de restabelecer a eritropoese normal com pouco risco de recidiva ou desenvolvimento de doenças clonais.<sup>44-46</sup>

### **1.5.2 TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA**

Baseando-se nas pesquisas realizadas em roedores, identificando os HLAs e demonstrando que a infusão intravenosa de medula óssea de um doador protege o receptor

frente a uma injúria letal,<sup>47</sup> Thomas e seus colaboradores realizaram, no final da década de 60, o primeiro transplante de medula óssea alogênico com sucesso,<sup>48</sup> e posteriormente desenvolvendo novas técnicas.<sup>49</sup>

Várias doenças hematológicas benignas beneficiam-se deste procedimento. Além da própria anemia aplástica, podem-se citar: as hemoglobinopatias, a anemia falciforme, as doenças caracterizadas por insuficiência medular hereditária (Anemia de Blackfan Diamond, Síndrome de Seckel, Síndrome de Swachman-Diamond, Síndrome de Kostelmann, Amegacariocitose congênita)<sup>50</sup> e a Anemia de Fanconi.<sup>51</sup> Na Europa, segundo os dados do IBMTR, 2% dos transplantes foram devidos à anemia aplástica.<sup>52</sup>

Nos pacientes submetidos ao transplante singênico sem condicionamento, deveria haver uma correção permanente na função da medula óssea; porém naquelas onde a insuficiência da medula óssea foi causada por anormalidades no sistema imune, a melhora só pode ocorrer quando o transplante é precedido pelo condicionamento.<sup>25,53</sup>

Para pacientes sem um gêmeo idêntico, o TMO alogênico HLA compatível é a melhor escolha,<sup>54</sup> mas como a possibilidade de encontrar-se um doador completamente compatível é de 25%, torna-se disponível para uma minoria de pacientes.<sup>16</sup> Para os restantes, a identificação de um doador não familiar, HLA idêntico ou de um doador familiar com uma pequena disparidade na compatibilidade podem tornar-se uma opção viável.<sup>55,56</sup> Os resultados são diretamente relacionados com o grau de compatibilidade,<sup>57-60</sup> e o risco da DECH crônica neste grupo é de 73%.<sup>61</sup>

#### **1.5.2.1 RESULTADOS**

O transplante de medula óssea é efetivo em restabelecer a hematopoese normal na maioria dos pacientes. Para grupos não selecionados, a mortalidade está entre 10% e 30%,

relacionada com as variações de tratamento e centros onde são realizados. Em Seattle a sobrevida aumentou de 45% entre 1970 e 1976, para 60% de 1977 a 1988 e 90% entre 1988 a 1993.<sup>62</sup> Essas melhorias devem-se a inúmeros avanços, entre os quais: regimes de condicionamento mais intensos para prevenir a rejeição; uso de ciclosporina para melhorar na pega e prevenir a DECH; melhora na qualidade nos derivados de sangue reduzindo a alo-sensibilização e desenvolvimento nos cuidados de suporte com novos agentes antimicrobianos e antivirais.<sup>32</sup>

Camitta e colaboradores publicaram um estudo prospectivo, comprovando que o TMO foi mais eficaz que os tratamentos convencionais na década de 70.<sup>63</sup> A redução do risco da DECH aguda, DECH crônica<sup>64-67</sup> e pneumonite intersticial pelo uso da CSA contribuiu para a melhora na sobrevida.<sup>68</sup>

A excelente sobrevida e uma baixa morbidade em pacientes jovens faz do transplante alogênico de medula óssea o tratamento de escolha para crianças e adolescentes. A maioria dos pacientes que sobrevivem mais de cinco anos estão em boas condições de saúde, e entre 93% a 89% conseguem voltar às suas atividades de escola ou trabalho;<sup>69</sup> no entanto, os pacientes com mais de 40 anos possuem um alto risco de morbidade e mortalidade.<sup>70</sup> Outros fatores que influenciam na sobrevida são o tempo prolongado entre o diagnóstico e o transplante, múltiplas transfusões<sup>71</sup> e infecções antes do transplante.<sup>16,54</sup>

Análises de qualidade de vida em pacientes submetidos ao TMO HLA idêntico familiar demonstraram resultados de bom a excelente em 80% e ruim em 5%.<sup>72</sup> Para aqueles com HLA compatível não familiar alcançaram uma sobrevida de 56% em 3 anos após o transplante.<sup>73</sup>

A rejeição do enxerto representa, na maioria dos receptores, a destruição das células do doador pelas células ativas do sistema imune do hospedeiro. Os fatores que predis põem

para a rejeição incluem: transfusões de sangue prévias,<sup>74</sup> condicionamentos menos intensos, uso de metotrexato isolado para prevenir a DECH a remoção de células T do enxerto<sup>75</sup>, infecção por citomegalovírus e drogas. A incidência de aloimunização está aumentada nos pacientes politransfundidos e se correlaciona com a rejeição de enxerto e refratariedade transfusional. O uso de produtos de sangue com depleção de leucócitos pode reduzir em muito este risco.<sup>76</sup>

Deeg e colaboradores identificaram cinco fatores de risco para rejeição: o ano em que o transplante foi realizado, um número grande de transfusões antes do transplante, uma resposta positiva à cultura mista de leucócitos, baixa dose de células infundidas no transplante, e a omissão de infusão do *buffy-coat* em pacientes politransfundidos.<sup>67</sup> Champlin e colaboradores encontraram como maiores fatores para redução do risco de rejeição do enxerto a radiação como condicionamento pré-transplante e o uso de CSA associada ao metotrexato como prevenção da DECH.<sup>75</sup> Bacigalupo e colaboradores salientam a importância da infusão de um maior número de unidades formadoras de colônias como fator interferindo na qualidade da pega.<sup>77</sup>

### **1.5.3 IMUNOSSUPRESSÃO**

#### **1.5.3.1 CORTICOSTERÓIDES**

Em um estudo prospectivo randomizado com 110 pacientes portadores de AAS, comparando TMO, tratamento de suporte e androgênios, a sobrevida foi melhor para os pacientes transplantados, e os androgênios não tiveram valor significativo no tratamento desses pacientes.<sup>78</sup>

A metilprednisolona em doses modestas não é eficaz no tratamento da AAS, mas doses elevadas (20 a 50 mg/kg/dia), podem induzir respostas hematológicas; no entanto, o resultado é inferior a GAT ou à CSA.<sup>28</sup>

#### **1.5.3.2 GLOBULINAS ANTI-LINFOCÍTICAS**

Tanto a GAL quanto a CSA inibem a função das células T, especialmente na produção de linfocinas supressivas. A administração de GAL reduz rapidamente os linfócitos circulantes a menos de 10% do valor inicial, continuando posteriormente com percentual reduzido.<sup>79</sup>

O mecanismo de ação do GAT é mediado pelo seu efeito imunossupressor nos linfócitos, podendo ter um efeito inibidor nas células-tronco hematopoéticas e células progenitoras. Há um efeito inibitório nas células CD8<sup>+</sup> com uma ação supressiva no crescimento das células hematopoéticas progenitoras.<sup>80</sup>

Estudos na década de 80 utilizando-se a GAL mostram respostas de 45% incluindo ensaios randomizados e multicêntricos,<sup>27</sup> não havendo diferença entre a GAL e a GAT. Efeitos colaterais transitórios relacionados ao tratamento com a GAT incluem anafilaxia, urticária, febre, espasmo brônquico, trombocitopenia e doença do soro.<sup>26</sup>

#### **1.5.3.3 CICLOSPORINA A**

Os estudos mostram respostas de 50% em pacientes refratários ao GAT ou GAL,<sup>29</sup> com melhoras ocorrendo poucos meses após o início do tratamento e geralmente mantidas após a suspensão da administração da ciclosporina. Os melhores resultados são vistos em altas doses por via oral (12mg/kg/dia em adultos e 15mg/kg/dia em crianças).<sup>81</sup> O seu uso prolongado pode causar elevação da pressão arterial, convulsões, hipomagnesemia e

insuficiência renal.<sup>82</sup> Estudos comparando CSA e GAT associados à prednisona mostraram-se equivalentes.<sup>83</sup>

#### 1.5.3.4 IMUNOSSUPRESSÃO COMBINADA

A terapia imunossupressiva, combinando-se CSA ou GAT a outras drogas, resultou em uma resposta e sobrevida melhores que o uso de agentes únicos.<sup>16,31,82</sup> Em estudos randomizados a combinação de GAT, CSA e metilprednisolona mostrou respostas superiores às aquelas com GAT e metilprednisolona (com um índice de remissão de 70%, contra 46% em 6 meses), aumentando o índice de sobrevida dos pacientes com AAS.<sup>84</sup> Em organizações governamentais nos Estados Unidos da América alcançaram-se respostas acima de 78% em pacientes com AAS tratados com GAT e CSA, com uma sobrevida de 72% em 2 anos e a possibilidade de recidiva de 36%.<sup>31</sup> No estudo piloto do grupo europeu, avaliaram a adição de fatores de crescimento ao regime imunossupressor. Os pacientes foram tratados com GAT, CSA e fator estimulante de colônias de granulócitos, obtendo-se uma resposta de 82%, em 1 ano e 92% em 34 meses.<sup>28</sup> Com relação ao número de cursos de GAL, apenas um curso de imunossupressão (IS) é tão eficaz quanto dois cursos.<sup>85</sup> Os estudos indicam que a IS mais intensa é mais efetiva que o uso de ciclosporina ou GAL isolados na AAS (tabela 1).<sup>16</sup>

Comparando-se o uso de GAL isolada e a associação de fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos com eritropoetina, Shao *et al.* mostrou, em seu ensaio clínico, uma diferença significativa na sobrevida e no índice de remissão completa a favor do esquema combinado. A recuperação hematológica foi mais rápida e completa, com grande redução nas necessidades de transfusão e um menor índice de infecções.<sup>86</sup>

Para avaliar o impacto de pacientes adultos com AAS, que foram submetidos ao tratamento com IS apesar da disponibilidade de doador HLA compatível, a eficácia do TMO

após a falha na resposta à IS não foi comprometida, ocorrendo o restabelecimento da hematopoese e independência das transfusões sanguíneas.<sup>87</sup>

**TABELA 1** IMUNOSSUPRESSÃO INTENSA NA AAS

Estudo/ano	Alemão multicêntrico <sup>84</sup>	EGBMT, 1995 <sup>28</sup>	NIH, 1995 <sup>31</sup>
Regime	GAL+CSA	GAL+CSA+G-CSF	GAT+CSA
Número de pacientes	43	40	51
Idade (mediana) / variação da idade	32(70-80)	16(2-72)	28(3-79)
Neutrófilos/ $\mu\text{L}$ (mediana) / %de casos $<200/\text{mm}^3$	0,48/19%	0,19/50%	0,34/42%
Resposta	70% em 6 meses	82% em 1 ano	78% em 1 ano
Sobrevida	64% em 41 meses	92% em 34 meses	86% em 1 ano 72% em 2 anos
Recidiva	11%	3%	18% em 1 ano 36% em 2 anos
Acompanhamento (mediana em dias)	516(183-1.295)	428(122-1.005)	912(218-1.714)

YOUNG, N. S.; BARRET, A. J. The treatment of severe acquired aplastic anemia. *Blood.*, 85:3367-3377, 1995. GAL, globulina anti-linfocítica; GAT, globulina anti-timocítica; CSA, ciclosporina A; G-CSF, fator estimulante de colônias de granulócitos; EGBMT, European Group for Bone Marrow Transplantation; NIH, National Institute of Health

#### 1.5.4 COMPARAÇÃO ENTRE O TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA E A IMUNOSSUPRESSÃO

Os estudos comparando TMO e IS mostram que há uma melhora na sobrevida associada ao TMO como tratamento primário em pacientes jovens que não receberam transfusões sanguíneas antes do transplante, e com uma contagem absoluta de neutrófilos mais elevada.<sup>70</sup>

Em estudos retrospectivos do Grupo Europeu de TMO (EGBMT), a sobrevida de pacientes tratados com TMO alogênico e doador compatível não apresentam diferenças com os pacientes que receberam GAT com ou sem androgênios. Análises de subgrupos mostraram que o TMO foi superior em pacientes com AAS abaixo de 20 anos e a IS foi superior em pacientes com 20 anos ou mais.<sup>88,89</sup>

A incidência de doenças hematológicas em pacientes com AAS tratados com imunossupressor é de 7 e 15%, como a HPN, desordens mielodisplásicas e leucemias

agudas.<sup>42,90-95</sup> O risco de doença maligna para os pacientes submetidos ao TMO para AAS, é de 0 e 3,1%.<sup>43,72</sup> No estudo europeu para a AAS, a incidência de câncer acumulada em 10 anos após a imunossupressão foi de 18,8% e para o TMO foi de 3,1%.<sup>43,96</sup>

Um estudo na Universidade de Columbia no Canadá, com 27 crianças, comparando IS e TMO alogênico HLA idêntico como tratamento primário, demonstrou equivalência na sobrevida e independência de transfusões sanguíneas para os dois grupos.<sup>97</sup>

### 1.5.5 OUTRAS ABORDAGENS

Há 50 a 63% de chance de resposta a uma segunda ou posteriores aplicações de GAT. De modo convencional a GAT equina é usada no primeiro curso de tratamento e a de coelhos como segunda opção para evitar reação anafilática ou alérgica. Tichelli e colaboradores publicaram estudo com uso de dois ou mais cursos de GAT, com uma resposta de 63% no segundo curso e 57% nos subseqüentes.<sup>98</sup>

O uso de altas doses de ciclofosfamida sem suporte de células-tronco hematopoéticas tem sido executado de modo experimental; entretanto, até que este regime seja seguro e efetivo, não se recomenda a sua utilização fora de ensaios clínicos.<sup>30</sup>

Os fatores de crescimento, de modo isolado, não são efetivos e apresentam um perigo potencial para pacientes com anemia aplástica; podem precipitar hemorragia e provocar um atraso no tratamento específico com TMO ou IS.<sup>30</sup> Em um estudo multicêntrico e randomizado, a eritropoetina em associação com fator estimulante de colônias de granulócitos foi uma alternativa efetiva para pacientes com anemia aplástica não severa.<sup>99</sup>

Para pacientes que não possuem doadores HLA compatíveis, o transplante de células progenitoras CD34<sup>+</sup> de pais saudáveis pode ser útil e aplicável, entretanto deve ser empregado um regime de condicionamento bastante intenso para que se ultrapasse o risco de rejeição.<sup>100</sup>



## 1.6 QUIMERISMO

### 1.6.1 DEFINIÇÃO

A definição de quimera completa é o encontro de 100% de células do doador na MO ou SP do receptor, e o quimerismo misto ocorre quando se encontram tanto células hematopoéticas do doador quanto do receptor seguindo o décimo quarto dia após o TMO.<sup>101</sup>

### 1.6.2 TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO

A avaliação do quimerismo pode ser realizada através de vários métodos. Os métodos mais rudimentares incluíam a tipagem sanguínea de doadores (disparidade de tipo sanguíneo), a citogenética, que pode ser analisada pelo cariótipo de doadores com disparidade de sexo,<sup>102,103</sup> e mais recentemente, os métodos moleculares com amplificação do DNA pela PCR (reação da polimerase em cadeia) mostrando ser de grande versatilidade e sem restrições.<sup>101,104-109</sup> A citogenética convencional foi menos sensível que a PCR, no entanto foi considerada de muita utilidade na investigação do quimerismo.<sup>110</sup>

A introdução da PCR como método de uma amplificação rápida do DNA *in vitro* tem proporcionado uma alternativa na análise do polimorfismo em regiões específicas do DNA humano. A amplificação da sequência de polimorfismos é ideal para a avaliação do quimerismo hematopoético após TMO alogênico entre os pares de irmãos HLA idênticos. Devem ser analisados inúmeros loci genéticos com polimorfismo para alcançar uma alta probabilidade de se obter pelo menos um locus informativo.<sup>101</sup> A maior vantagem do uso da análise baseada na PCR é o aumento da sensibilidade, a possibilidade de detectar-se uma pequena proporção do DNA do doador ou receptor, bem como a não necessidade de disparidade de sexo ou tipagem sanguínea para sua utilização.<sup>104</sup>

As sondas de oligonucleotídeos sintéticos complementares às unidades de repetição VNTR (Variable Number of Tandem Repeats), são capazes de detectar um quimerismo misto hematopoético, quando o DNA do receptor estiver presente de 0,05 a 1% do DNA leucocitário total.<sup>105</sup> A pega da medula do doador deve ser determinada após o 15º dia pós-transplante.<sup>101</sup>

As regiões hipervariáveis do genoma humano são altamente pleomórficas devido à variação no número das seqüências de duplicação repetidas em alelos diferentes (locus VNTR).<sup>105</sup> Esses marcadores são herdados através do modelo Mendeliano, trazendo valiosas informações quando o locus possui muitos alelos. Geralmente estes polimorfismos multialélicos têm sido de muita utilidade para o estudo da pega da medula após o TMO alogênico.<sup>104,107-109</sup>

A VNTR consiste de repetições duplas de uma seqüência curta que são altamente polimórficas devido às diferenças entre os alelos no número de cópias das repetições. As regiões da VNTR são altamente informativos como marcadores genéticos. O inicializador delimita a região a ser replicada em cada número da VNTR usada na amplificação, e os fragmentos resultantes são analisados posteriormente em gel-eletroforese tanto para a hibridização ou após transferência no método *Southern blot*.<sup>101</sup>

Várias publicações têm demonstrado amplas aplicações em diversas regiões de amplificação da VNTR, entre elas os locus 33.1, 33.4, 33.6,<sup>111</sup> Ynz22, H-ras e 3'HVR-globin,<sup>112</sup> D1S80, ApoB e D17S5<sup>109</sup> e outras.<sup>113-115</sup> Estes segmentos altamente polimórficos podem ser detectados através das sondas sintéticas de oligonucleotídeos locus específico e detectar seis diferentes regiões de hipervariação do genoma humano.<sup>101</sup>

### 1.6.3 CORRELAÇÃO CLÍNICA

Estudos dos marcadores genéticos no sangue e medula óssea, incluindo cariótipo, alotipos de imunoglobulinas, enzimas das células brancas e vermelhas do sangue, polimorfismo da extensão do fragmento das enzimas de restrição e antígenos das células vermelhas são úteis para estabelecer a presença de células do doador ou do receptor, e portanto pode-se avaliar a evolução da pega.<sup>102,111</sup> O desaparecimento das células do doador, seguido pelo reaparecimento das células do receptor, tem sido associado com a rejeição do enxerto, mais freqüentemente à recidiva da doença ou ainda à recuperação autóloga da função medular do paciente.<sup>116</sup>

A maioria dos pacientes submetidos ao TMO por AAS apresenta uma coexistência de células do doador e do receptor a partir do décimo quarto dia do transplante. A incidência do quimerismo misto nestes estudos situou-se entre 50% e 60%.<sup>102,117-119</sup>

Muitos fatores estão relacionados ao quimerismo após o transplante de medula óssea: tipo de doador, regimes de condicionamento, depleção de células T, profilaxia da DECH, doença de base e idade.<sup>103</sup> A incidência de DECH aguda grau II a IV foi significativamente menor para o grupo de quimerismo misto.<sup>120-122</sup> A incidência da DECH crônica foi similar nos dois grupos e não influenciou significativamente para a sobrevida.<sup>102,113</sup>

O quimerismo completo é mais freqüente nos regimes de condicionamento mais intenso. Foi encontrado quimerismo completo na maioria dos pacientes condicionados com radioterapia.<sup>113,123</sup> Resultados semelhantes foram alcançados com regimes contendo GAL<sup>124</sup> e bussulfano.<sup>125</sup> A presença de células dos receptores é mais freqüente em pacientes condicionados com ciclofosfamida isolada.<sup>102,113</sup>

O quimerismo completo foi a regra para os sobreviventes por longos períodos na AAS após TMO. Entretanto, o quimerismo misto pode ser encontrado em alguns pacientes

que receberam condicionamento com ciclofosfamida isolada, mantendo-se com níveis hematológicos estáveis em todas as séries. A rejeição pode ocorrer muito tardiamente e sugeriu-se uma monitorização rigorosa destes indivíduos pela análise do quimerismo.<sup>113</sup>

Os mecanismos precisos que levam ao quimerismo misto não estão bem esclarecidos. É provável que haja necessidade tanto do efeito de regimes mieloablativos quanto reação das células T do doador contra as células imunológicas do receptor.<sup>102</sup>

A influência do quimerismo misto na rejeição do enxerto ainda é um assunto que gera debate. O desenvolvimento de técnicas capazes de quantificá-lo tem permitido uma melhor análise do problema.<sup>126</sup> Em pacientes com talassemia submetidos ao TMO, a probabilidade de rejeição foi maior e proporcional à intensidade do quimerismo misto.<sup>127</sup>

Nos pacientes submetidos ao TMO por doenças malignas, a probabilidade de recidiva e sobrevida foi similar tanto em pacientes com quimerismo misto quanto naqueles com quimerismo completo, excetuando-se em pacientes com leucemia mielóide crônica, nos quais o índice de recidiva foi significativamente superior para o quimerismo misto, sendo um instrumento para detecção precoce e auxílio no tratamento.<sup>114,115,117,121,128-130</sup> Entretanto, outros estudos não comprovaram um aumento da taxa de recidiva determinado pelo quimerismo misto.<sup>131-135</sup> A incidência de recidiva não teve influência em relação ao método de coleta das células-tronco. Tanto o transplante de células-tronco periféricas como o TMO foram semelhantes.<sup>136</sup>

O risco de falha da pega do enxerto está aumentado nos pacientes com mais de 10% das células do receptor.<sup>117</sup> Entretanto as células do hospedeiro podem persistir por longos períodos sem que haja sinal de recidiva da doença.<sup>103</sup>

A rejeição foi observada com maior frequência em pacientes submetidos a múltiplas transfusões antes do transplante, sugerindo uma sensibilização das células do receptor.

Entretanto não há dependência entre o quimerismo e transfusões prévias, porque os estudos com análise multivariada excluem este fator.<sup>102</sup>

## **2 OBJETIVOS**

Determinar a interação entre as variáveis: idade, sexo, número de transfusões pré-transplante, etiologia, duração da doença, número de neutrófilos pré-transplante, condicionamento, número de células infundidas, tempo para atingir  $>500$  neutrófilos/ $\mu\text{L}$ , tempo para atingir  $>50.000$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ , tempo para atingir  $>100.000$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ , DECH aguda e DECH crônica, com a ocorrência do quimerismo e da rejeição, em portadores de AAS submetidos ao transplante de medula óssea alogênico.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo abrangeu 111 dos 291 pacientes portadores de anemia aplástica severa, que foram submetidos ao TMO alogênico aparentado no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, no período de 15 de outubro de 1979 a 22 de maio de 1998.

O estudo foi retrospectivo e os critérios de inclusão foram: condicionamento com ciclofosfamida 200 mg/kg, associação de ciclofosfamida 120 mg/kg e bussulfano 12 mg/kg, avaliação do quimerismo realizada após 80 dias do transplante.

A aplicação dos critérios de inclusão identificou 111 pacientes os demais foram excluídos por: condicionamento diferente ao acima mencionado em 18, óbito antes dos 80 dias pós-transplante em 56, óbito antes de se realizar o exame do quimerismo em 44 e não foram realizados os testes para avaliação do quimerismo pela ausência do paciente no retorno à consulta, estar aguardando a amostra do doador e ou receptor ou por dificuldades técnicas na realização do exame em 62. Do total dos pacientes, apenas 3 são após um segundo transplante.

#### **3.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

A idade dos pacientes variou de 2 a 38 anos com uma mediana de 18 anos e média de 18,6 anos, 68,4% deles entre 6 e 25 anos. A distribuição por sexo foi de 76 (68,4%) para sexo masculino e 35 (31,6%) para o sexo feminino.

O tempo de duração da doença variou de 1 a 144 meses, com uma média de 8,7 e a mediana de 4 meses, portanto nos primeiros 6 meses do início dos sintomas em 71,9% dos pacientes.

O número de transfusões prévias em unidades de hemoderivados fora obtido por informação do paciente ou familiares, variou de 0 a 238 unidades, com a mediana de 18,5 e a média de 27. O número de neutrófilos pré-transplante variou de 0 a 3835  $\mu$ L de sangue, a mediana de 322 e a média de 479.

Nos grupos étnicos, houve um predomínio da raça branca com 89 pacientes (80,1%), negros em 11 (9,6%), mulatos em 8 (7,9%) e da raça amarela em 3 (2,4%).

No tratamento prévio ao transplante (realizado antes de ingressar na unidade), foi observado que 68 (61,2%) pacientes não haviam sido submetidos a qualquer tipo de tratamento; os restantes utilizaram androgênios de forma isolada em 2 (1,8%), corticosteróides e androgênios em 9 (8,1%), corticosteróides em 15 (13,5%), ciclosporina A associada a corticosteróides em 8 (7,2%), e outras substâncias em 9 (8,2%) como: ácido fólico, globulina anti-timocítica, eritropoetina, fatores de crescimento e anti-fibrinolíticos.

Na tabela 2 está representada a distribuição dos pacientes transplantados por AAS.

**TABELA 2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

	Número	Mediana (Amplitude)
Número de pacientes	111	-
Sexo (Masculino / Feminino)	73/35	-
Idade (anos)	-	18 (2-38)
Tempo de doença (meses)	-	4 (1-144)
Número de Transfusões pré-TMO	-	18,5 (0-238)
Raça (Branca / Não branca)	89/22	-
Tratamento pré-Transplante (Sim / Não)	43/68	-
Etiopatogenia (Idiopática / Outras)	91/20	-

A identificação da etiopatogenia da anemia aplástica depende de dados clínicos que nem sempre podem ser comprovados. Dos 111 pacientes, foram classificados como idiopática



em 91 (81,9%), solventes orgânicos em 9 (8,1%), agrotóxicos em 6 (5,3%), pós-hepatite em 2 (1,8%), cloranfenicol em 1(1,1%) e pós-gestação em 2 (1,8%).

A definição de AAS foi baseada nos critérios estabelecidos por Camitta e colaboradores em 1975.<sup>63</sup>

### **3.2 CARACTERÍSTICAS DO TRANSPLANTE**

Todos os pacientes receberam a medula óssea de doador irmão, compatível para antígenos leucocitários humanos (sistema HLA). O estudo de compatibilidade incluiu a tipagem dos loci A, B, pelo método sorológico e a realização da cultura mista de linfócitos para o locus D.

As tipagens HLA foram realizadas com células mononucleares de sangue periférico, purificadas por gradiente de densidade em Ficoll-Hypaque. A técnica utilizada foi a de microcitotoxicidade modificada por Amos,<sup>103</sup> a qual se fundamenta na lise celular mediada por anticorpo específico na presença de complemento.

As doses de ciclofosfamida 200mg/kg foram divididas em quatro sub-doses, iniciando no dia -5 do transplante, sendo infundida em 30 minutos precedidos de hidratação vigorosa e continuados posteriormente por vinte e quatro horas após seu término. Eram também administrados anti-eméticos em altas doses e medidas preventivas de cistite hemorrágica associadas à administração de ciclofosfamida em altas doses. O bussulfano foi administrado também em quatro dias na dose de 12 mg/kg, concomitante à ciclofosfamida na dose de 120 mg/kg. Devido ao risco de convulsões, os pacientes receberam hidantoína no período de condicionamento.

Na imunoprofilaxia da doença do enxerto contra hospedeiro foram utilizados metotrexato (MTX) como droga isolada na dose de 15mg/m<sup>2</sup> no dia +1 e 10mg/m<sup>2</sup> nos dias

+3, +6, +11 e semanalmente até o dia +102. O MTX, associado à CSA, foi administrado no máximo até o dia +11 e a CSA foi iniciada no dia -1 via intravenosa 1,5mg/kg a cada doze horas, até o paciente poder ingeri-la por via oral na dose de 6,25mg/kg a cada doze horas. O nível sérico de CSA foi monitorado e procurava-se mantê-lo entre 200 e 400 ng/ml se os níveis de creatinina permitissem. Esta droga foi mantida por seis a doze meses. No estudo, seis pacientes fizeram uso de MTX como droga isolada e os 105 restantes a associação de MTX e CSA.

Treze pacientes receberam transfusão de leucócitos, obtidos do doador da medula, através de processo manual ou de equipamento de aférese.

A identificação e estadiamento da doença do enxerto contra o hospedeiro aguda era identificada segundo os critérios publicados.<sup>75</sup> Sempre houve comprovação histológica por biópsia de pele, mucosa oral, gástrica, intestinal, retal e hepática, dependendo do órgão acometido. Nos casos da DECH aguda graus II a IV, iniciava-se prednisona via oral ou metilprednisolona via intravenosa nas doses de 2 a 10 mg/kg de peso por dia, até o desaparecimento completo dos sintomas, quando era reduzida a níveis suficientes para controle da DECH.

Os critérios para identificação e tratamento da doença contra hospedeiro crônica são baseados em publicações.<sup>138</sup> A prednisona foi utilizada isoladamente ou em associação com outras drogas como a azatioprina e a CSA, principalmente nos casos extensos e de alto risco. Após a alta hospitalar, até completar 100 dias de transplante, os pacientes se mantiveram em acompanhamento pelo ambulatório periodicamente; e, nos casos em que não houvesse complicações significativas, os pacientes seriam orientados para procurar seu médico de referência.

O número de células infundidas variou de  $1,38$  a  $12,9 \times 10^8/\text{kg}$  do receptor, média de  $3,61 \times 10^8$ , mediana de  $3,19 \times 10^8$ . Totalizando 75,4% dos pacientes receberam mais do que  $2,6 \times 10^8$  células nucleadas/kg do receptor e 91,2% dos pacientes receberam mais do que  $2 \times 10^8$  células/kg do receptor, importante para não comprometer a pega. A regeneração da medula óssea, para o tempo para atingir  $>500$  neutrófilos/ $\mu\text{L}$ , situou-se entre o dia +14 e +56, média de 25,6, mediana de +24,5. O tempo para atingir  $>50.000$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ , apresentou uma amplitude entre os dias +16 e +244, média de 34,2 e mediana de +26. A maior elevação está situada entre os dias +20 e +25. Para o tempo para atingir  $>100.000$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ , a amplitude esteve entre +17 e +380, com uma média de 54,8, mediana de +35. A maior ocorrência para alcançar este valor está situada entre os dias +31 e +35.

Dos 111 pacientes com AAS, o aparecimento de DECH aguda ocorreu em 13 pacientes (11,7%), a DECH crônica ocorreu em 23 pacientes (20,7%), e a rejeição em 27 pacientes (24,3%).

Com a finalidade de verificar a representatividade da casuística no grupo em estudo, comparou-se as características deste com a população dos pacientes transplantados no serviço de TMO no mesmo período (tabela 3). Não diferiram nos seguintes aspectos: idade, duração da doença, transfusões pré-transplante e número de neutrófilos pré-transplante. A ciclofosfamida isolada foi utilizada em 188 de 291 (64,6%) pacientes no grupo total e 65 de 111 (58,5%) no grupo em estudo, foi associada ao bussulfano em 95 de 291 (35,5%) no grupo total e 46 de 111 (41,5%) no grupo em estudo, valor  $p$  0,14.

**TABELA 3** COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO EM ESTUDO E A TOTALIDADE DE PACIENTES TRANSPLANTADOS POR AAS NO MESMO PERÍODO

Características Clínicas	Mediana		Valor p
	Estudo	Totalidade	
Número de pacientes	111	291	
Idade do paciente (anos)	18	20	0,08
Duração da doença (meses)	4	4	0,42
Número de transfusões prévias (unidades)	19	22,5	0,07
Número de neutrófilos pré-transplante (N <sup>o</sup> /μL)	300	288	0,67

### 3.2.1 CONDICIONAMENTO

O condicionamento apresentou correlações importantes na avaliação do quimerismo (tabela 4). A idade não apresentou diferença significativa entre os dois regimes de condicionamento. O número de transfusões pré-transplante apresentou uma mediana maior no grupo da ciclofosfamida associada ao bussulfano, com um valor  $p < 0,0001$ . Este fato já foi esperado, pois a partir de 1992 os pacientes com mais de 15 transfusões passaram a receber o condicionamento combinado.

A duração da doença foi maior no grupo combinado. Pela análise de correlação com o número de transfusões prévias o valor  $r$  foi 0,21 e o valor  $p$  0,02. Este fato foi observado particularmente naqueles com mais de 15 transfusões, com valor  $p$  de 0,01. O número de células infundidas foi maior para o grupo da ciclofosfamida isolada, valor  $p$  0,002. Isto deveu-se à procura em atingir-se um maior número de células quando optou-se por este regime de condicionamento.

A etiologia da AAS não foi diferente para os dois grupos, com 52 de 65 (80%) classificados como idiopática no grupo da ciclofosfamida e 40 de 46 (86,9%) no grupo combinado. O número de neutrófilos no internamento não mostrou diferença significativa entre os dois regimes.

TABELA 4 CONDICIONAMENTO E VARIÁVEIS PRÉ-TRANSPLANTE

	CFA		CFA+BU		Valor p
	Amplitude	Mediana	Amplitude	Mediana	
Idade (anos)	2 a 38	18	6 a 37	17,5	0,94
Duração da doença pré-transplante (meses)	1 a 108	3	1 a 144	4	0,03
Número de Neutrófilos pré-transplante (Nº)	0 a 3835	336	0 a 1705	288	0,23
Transfusões pré-transplante (unidades)	0 a 61	13	4 a 238	31,5	<0,0001
Número de células infundidas (Nºx10 <sup>8</sup> /kg)	2 a 12,9	3,5	1,3 a 6,2	2,7	0,002

Observou-se que a DECH aguda ocorreu em 5/65 (7,6%) pacientes condicionados com ciclofosfamida e 8/46 (17,3%) no tratamento combinado. A DECH crônica ocorreu em 17/65 (26,1%) no grupo da ciclofosfamida e 7/46 (15,2%) no tratamento combinado.

### 3.2.2 ANÁLISE DO QUIMERISMO

A análise citogenética foi realizada, em pacientes com disparidade de sexo entre o doador e o receptor, através do laboratório de citogenética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela obtenção de cromossomos metafásicos em amostras de medula óssea pelo método de Williams e colaboradores<sup>139</sup> com modificações, e as metáfases analisadas com a técnica com bandeamento GTG segundo Scheres.<sup>140</sup> Foram considerados satisfatórios apenas os estudos pela citogenética, com um número de metáfases  $\geq 10$ .

Para a análise do VNTR foi realizada a extração do material pelo método da reação da cadeia polimerase, e a amplificação de 6 loci genéticos (D1S80, SE33, HUM-TH01, E336, HUM-ARA, HUM-PTOX). Nos pacientes que não tinham amostras pré-transplante foram utilizados fios de cabelo para comparação com a amostra do doador e do receptor. Nos outros casos, utilizaram-se amostras pré- e pós-transplante do paciente, e as amostras do doador. A visualização foi feita pela coloração dos sais de prata por observação direta das bandas.<sup>141-144</sup>

### 3.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

No estudo estatístico para a comparação entre as variáveis foi utilizado o teste t de Student para as distribuições Gaussianas, para os testes não paramétricos o método de Mann Whitney e o teste Qui-quadrado para as tabelas de contingência. Para a análise univariada de correlação utilizou-se o método de Spearman. A análise multivariada do quimerismo foi feita pela regressão múltipla e a da rejeição pela regressão logística. O nível de significância foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ) bilateral. Os estudos estatísticos foram realizados através do *software* Graphpad<sup>R</sup>, Sgwin<sup>R</sup> e SPSS8<sup>R</sup>.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 QUIMERISMO

Os 111 pacientes estudados foram divididos em grupos de acordo com o grau de quimerismo encontrado pela análise dos VNTR, e citogenética. O quimerismo foi avaliado pela VNTR em 46 pacientes (41,4%), 31 no grupo da ciclofosfamida e 15 na associação de ciclofosfamida e bussulfano. A análise citogenética foi realizada em 65 pacientes (58,6%), em 34 utilizando-se a ciclofosfamida como condicionamento e em 31 associando a ciclofosfamida ao bussulfano. Na população em estudo encontrou-se quimerismo misto (<100%) em 74 dos 111 dos pacientes (66,6%). No grupo da ciclofosfamida isolada em 49 de 65 (75,3%) e na associação com o bussulfano em 25 de 46 (54,3%), com valor  $p = 0,02$ .

#### 4.1.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E O QUIMERISMO

Foram comparadas as características clínicas dos pacientes ao quimerismo através da análise univariada (tabela 5). As variáveis analisadas foram: sexo (masculino igual a 1 e feminino igual a 0), idade (anos), número de transfusões pré-transplante (unidades), etiologia da anemia aplástica (idiopática igual a 1 e outras igual a 0), duração da doença pré-transplante (meses), número de neutrófilos pré-transplante (neutrófilos/ $\mu\text{L}$ ), condicionamento (ciclofosfamida + bussulfano igual a 1 e ciclofosfamida isolada igual a 0), número de células infundidas (número de células  $\times 10^8/\text{kg}$  de peso do receptor), tempo para atingir  $>500$  neutrófilos/ $\mu\text{L}$  (dias), tempo para atingir  $>50.000$  plaquetas/ $\mu\text{L}$  (dias), tempo para atingir

>100.000 plaquetas/ $\mu$ L (dias), DECH aguda (presença de DECH aguda igual a 1 e a ausência igual a 0), DECH crônica (presença de DECH crônica igual a 1 e a ausência igual a 0).

**TABELA 5** CORRELAÇÃO ENTRE O QUIMERISMO E AS COVARIÁVEIS

Variáveis	Correlação	
	Valor - r	Valor p
Sexo (masculino/feminino)	-0,04	0,62
Idade (anos)	0,17	0,07
Número de transfusões pré-transplante (unidades)	0,22	0,01
Etiologia (Idiopática/outras)	0,02	0,80
Duração da doença pré-transplante (meses)	-0,03	0,73
Número de neutrófilos pré-transplante (neutrófilos/ $\mu$ L)	-0,05	0,58
Condicionamento (CFA=0/CFA+BU=1)	0,38	0,0001
Número de células infundidas ( $n^{\circ} \times 10^8/\text{kg}$ )	-0,07	0,42
Tempo para atingir >500 neutrófilos/ $\mu$ L (dias)	-0,10	0,26
Tempo para atingir >50.000 plaquetas/ $\mu$ L (dias)	-0,06	0,49
Tempo para atingir >100.000 plaquetas/ $\mu$ L (dias)	0,03	0,73
DECH aguda (Sim=1/não=0)	0,23	0,01
DECH crônica (Sim=1/não=0)	0,10	0,28

Observou-se uma correlação significativa entre o quimerismo e as variáveis: número de transfusões pré-transplante, condicionamento e DECH aguda.

Pela análise multivariada utilizando-se o método de regressão múltipla (tabela 6), construiu-se um modelo para correlacionar o quimerismo com as variáveis estudadas na análise anterior.

**TABELA 6** ANÁLISE MULTIVARIADA DO QUIMERISMO

Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	T Estatístico	Valor p
Constante	64,42	3,83	16,81	0,0000
Condicionamento (CFA=0/CFA+BU=1)	23,61	5,98	3,94	0,0001
Transfusões pré-transplante	0,04	0,09	0,49	0,62
DECH aguda (sim=1/não=0)	12,52	8,28	1,51	0,13

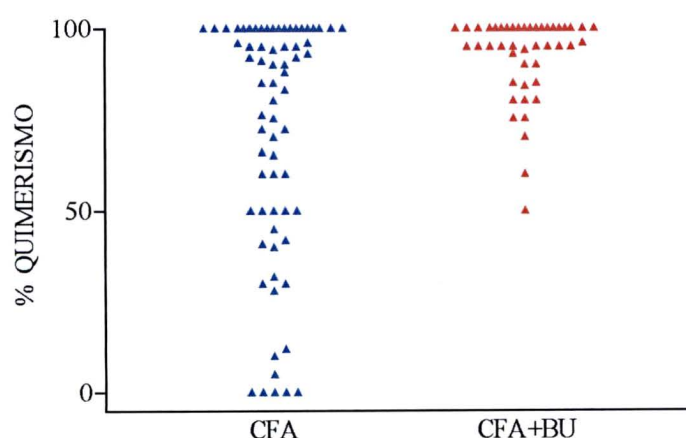
O valor de  $R^2$  (coeficiente de correlação múltipla ao quadrado) foi 19,72%, que explica a variabilidade no quimerismo. O  $R^2$  ajustado foi de 17,49%.

Apenas o condicionamento permaneceu como variável independente pela regressão múltipla. A média do percentual do quimerismo nos pacientes condicionados com



ciclofosfamida e bussulfano foi 92,2% e a mediana 95%, quando comparado à ciclofosfamida isolada, com uma média de 66,1% e a mediana de 75%. O valor p pelo teste Mann Whitney foi  $<0,0001$  (figura 1).

FIGURA 1 CORRELAÇÃO ENTRE O QUIMERISMO E O CONDICIONAMENTO



Há um predomínio de pacientes com maior percentual de quimerismo no grupo da ciclofosfamida associada ao bussulfano.

#### 4.1.2 QUIMERISMO E CICLOFOSFAMIDA ISOLADA

O quimerismo foi comparado às características clínicas, pela análise univariada (correlação de Spearman) das variáveis do grupo submetido ao condicionamento com ciclofosfamida isolada (tabela 7).

**TABELA 7 CORRELAÇÃO DO QUIMERISMO E AS COVARIÁVEIS NO GRUPO DA CICLOFOSFAMIDA ISOLADA**

Variáveis	Correlação	
	Valor - r	Valor p
Sexo (Masculino=1/feminino=0)	-0,05	0,64
Idade (anos)	0,16	0,17
Número de transfusões pré-transplante (unidades)	-0,08	0,47
Etiologia (Idiopática/outros)	0,01	0,89
Duração da doença pré-transplante (meses)	-0,09	0,43
Número de neutrófilos pré-transplante (N/ $\mu$ L)	0,05	0,67
Número de células infundidas (N x $10^8$ /kg)	0,12	0,29
Tempo para atingir >500 neutrófilos/ $\mu$ L (dias)	-0,10	0,39
Tempo para atingir >50.000 plaquetas/ $\mu$ L (dias)	-0,23	0,06
Tempo para atingir >100.000 plaquetas/ $\mu$ L (dias)	-0,07	0,52
DECH aguda (Sim=1/não=0)	0,16	0,19
DECH crônica (Sim=1/não=0)	0,20	0,10

Não houve correlação do quimerismo com as variáveis analisadas, ressaltando-se a importância do condicionamento como única variável influenciando o quimerismo.

#### **4.1.3 QUIMERISMO E CICLOFOSFAMIDA + BUSSULFANO**

O quimerismo foi comparado às características clínicas dos pacientes, pela análise univariada das variáveis dos pacientes submetidos ao condicionamento com ciclofosfamida associada ao bussulfano (tabela 8).

Não houve correlação entre o quimerismo e as variáveis analisadas, corroborando o modelo anterior da ciclofosfamida isolada.

**TABELA 8 CORRELAÇÃO ENTRE O QUIMERISMO E AS COVARIÁVEIS NO GRUPO DA CICLOFOSFAMIDA ASSOCIADA AO BUSSULFANO**

Variáveis	Correlação	
	Valor - r	Valor p
Sexo (masculino=1/feminino=0)	-0,01	0,94
Idade (anos)	0,09	0,53
Número de transfusões pré-transplante (unidades)	0,04	0,77
Etiologia (Idiopática=1/outras=0)	-0,04	0,76
Duração da doença pré-transplante (meses)	-0,28	0,06
Número de neutrófilos pré-transplante (N/ $\mu$ L)	-0,20	0,17
Número de células infundidas ( $N \times 10^8$ /kg)	-0,20	0,16
Tempo para atingir >500 neutrófilos/ $\mu$ L (dias)	-0,001	0,99
Tempo para atingir >50.000 plaquetas/ $\mu$ L (dias)	0,22	0,13
Tempo para atingir >100.000 plaquetas/ $\mu$ L (dias)	0,16	0,27
DECH aguda (Sim=1/não=0)	0,16	0,26
DECH crônica (Sim=1/não=0)	-0,06	0,66

## 4.2 REJEIÇÃO

Houve rejeição em 27 pacientes (24,3%). No grupo da ciclofosfamida isolada em 24/65 (36,9%) e no grupo da ciclofosfamida associada ao bussulfano em 3/46 (6,5%).

### 4.2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E A REJEIÇÃO

Através da análise univariada pelo método de correlação de Spearman, (tabela 9) a rejeição foi correlacionada com as variáveis descritas a seguir: sexo (masculino igual a 1 e feminino igual a 0), idade (anos), número de transfusões pré-transplante (unidades), etiologia da anemia aplástica (idiopática igual a 1 e outras igual a 0), duração da doença pré-transplante (meses), número de neutrófilos pré-transplante, condicionamento (ciclofosfamida+bussulfano igual a 1 e ciclofosfamida isolada igual a 0), número de células infundidas (número de células  $\times 10^8$ /kg de peso do receptor), tempo para atingir >500 neutrófilos/ $\mu$ L (dias), tempo para atingir >50.000 plaquetas/ $\mu$ L (dias), tempo para atingir >100.000 plaquetas/ $\mu$ L (dias), DECH

aguda (presença de DECH aguda igual a 1 e a ausência igual a 0), DECH crônica (presença de DECH crônica igual a 1 e a ausência igual a 0) e o quimerismo (percentual).

**TABELA 9 CORRELAÇÃO ENTRE A REJEIÇÃO E AS COVARIÁVEIS**

Variáveis	Correlação	
	Valor - r	Valor p
Sexo (Masculino=1/feminino=0)	0,02	0,80
Idade (anos)	-0,18	0,06
Número de transfusões pré-transplante (unidades)	-0,11	0,22
Etiologia (Idiopática=1/outras=0)	-0,007	0,93
Duração da doença pré-transplante (meses)	-0,01	0,91
Número de neutrófilos pré-transplante (N/ $\mu$ L)	0,21	0,02
Condicionamento (CFA/CFA+BU)	-0,35	0,0002
Número de células infundidas (N x $10^8$ /kg)	0,21	0,02
Tempo para atingir >500 neutrófilos/ $\mu$ L (dias)	0,13	0,15
Tempo para atingir >50.000 plaquetas/ $\mu$ L (dias)	0,12	0,18
Tempo para atingir >100.000 plaquetas/ $\mu$ L (dias)	0,01	0,85
DECH aguda (Sim=1/não=0)	-0,14	0,13
DECH crônica (Sim=1/não=0)	-0,09	0,32
Quimerismo (%)	-0,61	<0,0001

Pela análise univariada, a rejeição correlacionou-se com: o número de neutrófilos pré-transplante, o condicionamento, o número de células infundidas e o quimerismo.

Com base nestes resultados, construiu-se um modelo pela regressão logística, analisando a independência das variáveis e a predição da rejeição (tabela 10).

**TABELA 10 ANÁLISE MULTIVARIADA DA REJEIÇÃO**

Parâmetro	Estimativa	RC Estimada	Qui-quadrado	Valor p
Constante	0,99			
Condicionamento (CFA=0/CFA+BU=1)	0,48	1,62	0,401	0,52
Número de neutrófilos pré-transplante (N/ $\mu$ L)	0,0003	1,0004	0,516	0,47
Número de células infundidas (N x $10^8$ /kg)	0,323	1,382	4,011	0,05
Quimerismo (%)	-0,0553	0,946	33,32	<0,0001

RC – Razão de chances

O percentual de desvio explicado pelo modelo foi de 42,13% e o percentual ajustado foi de 34,01%.

O número de células infundidas e o quimerismo foram variáveis independentes para a predição da rejeição. Na tabela 11 há uma relação direta da rejeição ao número de células infundidas e inversa ao quimerismo.

**TABELA 11 VARIÁVEIS INDEPENDENTES À REJEIÇÃO**

Variáveis	Mediana		Valor p
	Com Rejeição	Sem Rejeição	
Número de células infundidas ( $N \times 10^8 / kg$ )	4,0	3,11	0,05
Quimerismo (%)	42	95	<0,0001

Dos 27 pacientes que rejeitaram, apenas um apresentava >90% de quimerismo. O percentual do quimerismo foi de 94%, a rejeição ocorreu 401 dias depois do exame e foi submetido a um segundo transplante. Neste mesmo grupo, outros 4 pacientes se submeteram a um segundo TMO. O tratamento com ciclosporina e prednisona foi iniciado em 19. Houve regeneração autóloga em 3.

Dos 23 pacientes com quimerismo <90% e que não rejeitaram, ela ocorreu entre 2 a 3 anos depois em 4 deles, e como regeneração autóloga em 2. Nos restantes, os níveis das células do sangue periférico encontravam-se estáveis. Em 8 pacientes não houve alteração significativa dos níveis do quimerismo. Observou-se que os pacientes permaneceram por longo tempo com quimerismo misto e com a doença estável.

#### **4.2.2 REJEIÇÃO E CICLOFOSFAMIDA ISOLADA**

O condicionamento foi encontrado como uma variável de grande influência para a rejeição. Analisou-se o grupo da ciclofosfamida isolada e a rejeição, através da correlação de Spearman (tabela 12).

Observou-se que houve correlação da rejeição apenas com a variável quimerismo. O número de rejeições aumenta de forma inversa ao quimerismo.

**TABELA 12 CORRELAÇÃO ENTRE A REJEIÇÃO E AS COVARIÁVEIS, NO GRUPO DA CICLOFOSFAMIDA ISOLADA**

Variáveis	Correlação	
	Valor - r	Valor p
Sexo (Masculino=1/feminino=0)	-0,02	0,86
Idade (anos)	-0,15	0,22
Número de transfusões pré-transplante (unidades)	0,15	0,22
Etiologia (Idiopática=1/outras=0)	0,03	0,79
Duração da doença pré-transplante (meses)	0,07	0,55
Número de neutrófilos pré-transplante (N/ $\mu$ L)	0,06	0,62
Número de células infundidas (N x 10 <sup>8</sup> )	0,07	0,52
Tempo para atingir >500 neutrófilos/ $\mu$ L (dias)	0,08	0,48
Tempo para atingir >50.000 plaquetas/ $\mu$ L (dias)	0,19	0,12
Tempo para atingir >100.000 plaquetas/ $\mu$ L (dias)	0,03	0,77
DECH aguda (Sim=1/não=0)	-0,07	0,57
DECH crônica (Sim=1/não=0)	-0,18	0,14
Quimerismo (%)	-0,59	<0,0001

#### 4.2.3 REJEIÇÃO E CICLOFOSFAMIDA + BUSSULFANO

Com o mesmo modelo seguido anteriormente, a rejeição foi correlacionada pela análise univariada, com as demais variáveis. Neste modelo foram incluídos apenas os pacientes condicionados com ciclofosfamida associada ao bussulfano (tabela 13).

**TABELA 13 CORRELAÇÃO ENTRE A REJEIÇÃO E AS COVARIÁVEIS, NO GRUPO DA CICLOFOSFAMIDA ASSOCIADA AO BUSSULFANO**

Variáveis	Correlação	
	Valor - r	Valor p
Sexo (Masculino=1/feminino=0)	0,004	0,97
Idade (anos)	-0,24	0,09
Número de transfusões pré-transplante (unidades)	0,12	0,41
Etiologia (Idiopática=1/outras=0)	0,10	0,49
Duração da doença pré-transplante (meses)	0,16	0,27
Número de neutrófilos pré-transplante (N/ $\mu$ L)	0,23	0,10
Número de células infundidas (N x 10 <sup>8</sup> )	0,32	0,02
Tempo para atingir >500 neutrófilos/ $\mu$ L (dias)	0,09	0,51
Tempo para atingir >50.000 plaquetas/ $\mu$ L (dias)	-0,01	0,94
Tempo para atingir >100.000 plaquetas/ $\mu$ L (dias)	-0,03	0,82
DECH aguda (Sim=1/não=0)	-0,12	0,41
DECH crônica (Sim=1/não=0)	-0,10	0,49
Quimerismo (%)	-0,39	0,007

Foi observado que as variáveis número de células infundidas e quimerismo, apresentaram uma correlação significativa para a rejeição.

Efetuuou-se a análise multivariada (tabela 14) para excluir-se os efeitos das covariáveis.

TABELA 14 ANÁLISE MULTIVARIADA DA REJEIÇÃO NO GRUPO DA CICLOFOSFAMIDA ASSOCIADA AO BUSSULFANO

Parâmetro	Estimativa	RC Estimada	Qui-quadrado	Valor p
Constante	11,27			
Número de transfusões pré-transplante (unidades)	0,0544	1,057	3,62	0,06
Número de células infundidas ( $N \times 10^8$ )	2,429	11,35	1,85	0,17
Quimerismo (%)	-0,311	0,73	11,80	0,0006

RC – Razão de chances

O percentual de desvio explicado pelo modelo foi de 76,63% e o percentual ajustado foi de 40,56%.

A análise multivariada pela regressão logística confirmou o quimerismo como única variável independente para a rejeição.

Apenas três pacientes neste grupo apresentaram rejeição e todos com quimerismo <90%. Outros três pacientes com rejeição mas que não foram incluídos neste estudo apresentavam quimerismo de 35%, 70% e 50%. Observou-se que houve um grande risco de rejeição quando o quimerismo foi <90%.

## 5 DISCUSSÃO

A anemia aplástica é uma doença rara, e de prognóstico reservado nos pacientes com pancitopenia acentuada. São necessárias medidas urgentes nos casos mais graves. As medidas de suporte mais efetivas contribuíram muito para o sucesso do tratamento, mas foi o uso de drogas IS potentes e o transplante de medula óssea que mudaram o seu prognóstico.

A partir da década de 60, o TMO tornou-se um procedimento bem estabelecido para o tratamento de doenças hematológicas malignas e benignas como a AAS, talassemia major, anemia falciforme<sup>50</sup> e anemia de Fanconi.<sup>51</sup> Mostrou-se efetivo em restabelecer a hematopoese normal na maioria dos pacientes e, com os avanços recentes, a mortalidade relacionada ao procedimento foi reduzida drasticamente.<sup>32</sup>

A rejeição do enxerto pelas células ativas do sistema imune representa uma barreira ao sucesso do TMO. Vários fatores predis põem à sua ocorrência: pacientes politransfundidos,<sup>74</sup> condicionamentos menos intensos, regimes de imunoprofilaxia com MTX isolado, menor quantidade de células infundidas do doador e a remoção de células T do enxerto.<sup>75</sup>

Há mais de uma década, os autores têm observado regeneração autóloga após o transplante, correlacionando-a com sua evolução. O desaparecimento das células do doador, seguido pelo reaparecimento das células do receptor, está associado à rejeição do enxerto.

O estudo do quimerismo vem mostrando-se como uma ferramenta importante para a identificação de fatores prognósticos em pacientes submetidos ao TMO alogênico. Inicialmente de forma rudimentar, a análise dos tipos sanguíneos em pacientes com disparidade ABO ou Rh entre o doador e o receptor despertou o interesse sobre a ocorrência de hematopoese mista e suas implicações clínicas. Posteriormente, a análise do cariótipo foi



realizada em pacientes com disparidade de sexo entre o doador e o receptor, tornando possível uma avaliação quantitativa entre o percentual de células do enxerto e do hospedeiro. Mais recentemente a utilização do VNTR, como método molecular e de maior sensibilidade, vem revolucionando o estudo do quimerismo.

O cariótipo como método de quantificação do quimerismo foi amplamente empregado no final da década de 80; entretanto, apesar de ser um método eficiente, apresentava uma limitação importante no seu uso exclusivo em pacientes com disparidade de sexo entre o doador e o receptor. Diez-Martin *et al.* compararam a citogenética convencional com o método molecular FISH (*Fluorescence in situ hybridization*). Ambos demonstraram a capacidade de quantificar o quimerismo, entretanto o método FISH foi mais sensível.<sup>110</sup> Bertheas identificou quimerismo misto em 29 de 60 pacientes avaliados utilizando-se a análise citogenética.<sup>120</sup> Hill *et al.* estudaram a influência do quimerismo misto em pacientes com AAS e que receberam TMO de doadores com disparidade de sexo.<sup>102</sup> Estes estudos mostraram que a análise do cariótipo pode ser empregada como método de avaliação quantitativa do quimerismo.

Atualmente, dá-se preferência aos métodos moleculares para a avaliação do quimerismo, pela sua maior sensibilidade e por não apresentar restrições. Ugozzoli *et al.* descreveram a utilização da amplificação pela PCR dos VNTRs combinados com oligonucleotídeos pela alta sensibilidade e pela necessidade de pequenas quantidades nas amostras coletadas.<sup>101</sup> Foram desenvolvidas inúmeras técnicas envolvendo o uso da PCR, demonstrando sua alta sensibilidade, em torno de 0,05 a 1%.<sup>104-109</sup> Portanto, com o aperfeiçoamento destas técnicas revolucionárias, nesta última década, os autores exibem uma clara preferência pelos métodos moleculares, principalmente quando se objetiva a detecção de doença residual ou recidiva precoce em doenças malignas.

A necessidade de um número expressivo de pacientes em uma única instituição para a análise do quimerismo determinou a utilização de dois métodos distintos na sua avaliação. Como observa-se na literatura, os estudos prospectivos em doenças benignas são raros e com número reduzido de pacientes.<sup>127</sup> A combinação do cariótipo e da VNTR para a análise do quimerismo, apesar de métodos diferentes, apresenta resultados semelhantes em doenças benignas.

Observou-se o quimerismo misto em 74/111 (66,6%) dos pacientes. Hill *et al.* identificaram uma ocorrência de 58,3% de quimerismo misto em pacientes com AAS, utilizando a análise citogenética.<sup>102</sup> Schattenberg utilizou a PCR para avaliar o quimerismo misto, encontrando um percentual de 67%.<sup>131</sup> Outros estudos com diversos tipos de população encontraram um percentual que variou entre 50 e 60%.<sup>117-119</sup> Portanto, o quimerismo misto é muito freqüente e este estudo encontra-se dentro do percentual dos outros estudos da literatura.

O quimerismo correlacionou-se com o condicionamento de modo muito significativo. Os pacientes submetidos ao condicionamento com ciclofosfamida isolada tiveram uma mediana no quimerismo de 75% e a associação de ciclofosfamida com bussulfano de 95%. O valor p foi 0,0001. O quimerismo misto (<100%) foi encontrado no grupo da ciclofosfamida isolada em 50 de 66 pacientes (75,3%) e na associação de ciclofosfamida com o bussulfano em 25/48 (54,3%).

O quimerismo misto foi mais freqüente nos pacientes que se submeteram ao condicionamento com ciclofosfamida isolada. Este resultado foi concordante com dados da literatura.<sup>102,113</sup> Do mesmo modo, os estudos reafirmaram uma freqüência maior do quimerismo completo para os regimes de condicionamento mais intensos. O uso da radioterapia associada no condicionamento foi inversamente correlacionado com o

quimerismo misto em pacientes com leucemia mielóide crônica.<sup>118</sup> Keable *et al.* encontraram quimerismo completo em 100% dos pacientes submetidos à radioterapia.<sup>123</sup> Gomez *et al.* observaram uma baixa frequência de quimerismo misto em pacientes com AAS recebendo condicionamento com radioterapia ou GAT.<sup>124</sup> Foi encontrado um percentual de 15,4% de quimerismo misto em pacientes condicionados com ciclofosfamida associada ao bussulfano.<sup>125</sup> Conforme os dados de literatura e deste ensaio clínico, o condicionamento foi o principal fator influenciando o quimerismo.

Em alguns estudos o número de transfusões prévias foi um fator importante influenciando o quimerismo. Hill *et al.* demonstraram que a presença do quimerismo misto foi independente às transfusões prévias e à infusão de leucócitos.<sup>102</sup> Este achado não foi confirmado neste estudo, estando correlacionado com o condicionamento empregado. A partir de 1991, os pacientes que apresentavam mais de 15 transfusões prévias foram preferentemente condicionados com ciclofosfamida e bussulfano. Quando analisamos diferentes tipos de condicionamento em subgrupos distintos, não houve influência desta variável em relação ao quimerismo. Mesmo nos subgrupos da ciclofosfamida isolada ou na associação com o bussulfano, não houve influência do número de transfusões prévias como variável independente para o quimerismo.

Neste estudo a incidência de DECH aguda grau II a IV ou DECH crônica não mostrou-se como variável independente para o quimerismo. Alguns estudos correlacionaram uma menor incidência de DECH aguda para os pacientes com quimerismo misto.<sup>120-122</sup> A incidência de DECH crônica foi similar.<sup>102,113</sup> Portanto os resultados são conflitantes e necessitam estudos prospectivos para sua definição.

A rejeição do enxerto é uma das complicações mais importantes do TMO, representando uma causa importante de falha do tratamento. É manifestada pela destruição

das células do enxerto pelo sistema imune do hospedeiro. São vários os fatores que interferem na rejeição: o número de transfusões prévias, a intensidade do condicionamento empregado, uso de CSA na imunoprofilaxia da prevenção da DECH e a remoção das células T do enxerto. A identificação de fatores que possam interferir na rejeição pode ser um instrumento de grande auxílio na seleção de pacientes que se beneficiem do tratamento precoce.

Vários estudos correlacionam o quimerismo com a rejeição, havendo um número maior de rejeição quanto maior o percentual de células do receptor. Há fatos que não estão bem esclarecidos quanto a qual evento ocorre primeiro: a rejeição ou o quimerismo misto, principalmente em tratando-se de estudos retrospectivos. A interferência do condicionamento mais ou menos intenso interfere no quimerismo e portanto também atua sobre a rejeição.

No estudo realizado, a rejeição ocorreu em 27 dos 111 pacientes (24,3%). No grupo da ciclofosfamida isolada em 24/65 (36,9%) e no grupo da ciclofosfamida associada ao bussulfano em 3/46 (6,5%). Houve correlação significativa do quimerismo com a rejeição pela análise multivariada. O percentual do quimerismo foi de 42% para os pacientes que rejeitaram e de 95% para os que não rejeitaram, valor  $p < 0,0001$ . Foi observado que todos os pacientes que rejeitaram apresentavam percentuais de quimerismo  $\leq 90\%$ .

Andreani *et al.* estudaram pacientes transplantados por talassemia e analisando o quimerismo, demonstraram que a probabilidade de rejeição foi maior naqueles com quimerismo misto e diretamente proporcional à quantidade de células do receptor.<sup>127</sup> Este efeito também foi observado nos estudos em doenças malignas. Shaternberg observou que a sobrevida livre de doença de 6 meses a 4 anos foi de 85% no quimerismo misto e 65% para o quimerismo completo e que o quimerismo misto não foi associado a uma maior incidência na recidiva.<sup>131</sup> O desaparecimento das células do doador seguido pelo reaparecimento das células do receptor tem sido associada com a rejeição do enxerto, mais frequentemente à recidiva da

doença ou ainda à recuperação autóloga da função medular do paciente.<sup>116</sup> Champlin e colaboradores encontraram como maiores fatores para redução do risco de rejeição, a radiação no condicionamento e o uso de CSA na prevenção da DECH.<sup>75</sup>

A rejeição foi mais freqüente nos pacientes com maior percentual das células do hospedeiro e nos pacientes condicionados com ciclofosfamida isolada. Isto foi esperado, pois os ensaios clínicos já haviam apontado este resultado. A ocorrência da rejeição e do quimerismo são fatos dinâmicos e seria difícil determinar em estudos retrospectivos qual foi o fato inicial ou a sua real importância.

Apesar de a rejeição ser uma das principais causas de óbito em pacientes com AAS, as células do hospedeiro podem persistir por longos períodos sem que haja sinal de piora dos níveis de hemoglobina ou das demais séries sangüíneas. O risco de falha na pega aumenta quando houver mais que 10% das células do receptor.<sup>110</sup>

Em 23 pacientes com quimerismo  $\leq 90\%$  e sem rejeição observou-se rejeição em 4 deles entre 2 a 3 anos mais tarde. A regeneração autóloga ocorreu em 2 pacientes. Nos restantes, os níveis das células do sangue periférico encontravam-se estáveis, com pequenas variações no percentual de quimerismo e com a doença estável.

Dos 27 pacientes que rejeitaram, apenas 1 apresentava  $>90\%$  de quimerismo; os demais todos tinham  $\leq 90\%$  das células do doador. Houve regeneração autóloga em 3 pacientes. O tratamento com ciclosporina e prednisona foi iniciado em 19 pacientes, com recuperação parcial ou completa da hematopoese.

Casado *et al.* demonstraram que quimerismo completo foi a regra para os sobreviventes por longos períodos na AAS após TMO, entretanto o quimerismo misto pode ser encontrado em alguns pacientes que receberam condicionamento com ciclofosfamida isolada, mantendo-se com níveis hematológicos estáveis em todas as séries. A rejeição pode

ocorrer muito tardiamente e sugeriu-se uma monitorização rigorosa destes indivíduos pela análise do quimerismo.<sup>113</sup> Os mecanismos precisos que levam ao quimerismo misto não estão bem esclarecidos. Provavelmente é necessário tanto o efeito de regimes mieloablativos quanto a reação das células T do doador contra as células imunológicas do receptor.<sup>102</sup> Entretanto as células do hospedeiro podem persistir por longos períodos sem que haja sinal de recidiva da doença.<sup>103,132</sup>

A correlação entre o maior número de células do receptor e a rejeição é um fato observado com muita frequência. As técnicas atuais para medir o grau de quimerismo permitem aferições confiáveis e sem restrições. A real importância deste evento deverá ser analisada em estudos prospectivos avaliando assim sua ocorrência correlação temporal com a rejeição, estipular prognóstico e análise da sobrevida.

A procura de criar um instrumento de predição para a rejeição nos pacientes pode tornar-se viável nos mesmos moldes em que Gail *et al.* utilizaram um modelo de regressão logística para o cálculo das probabilidades de desenvolvimento do câncer de mama em mulheres brancas examinadas anualmente.<sup>145</sup>

## 6 CONCLUSÕES

1. A ocorrência de quimerismo misto nos pacientes submetidos ao TMO alogênico em AAS foi de 66,6%.

2. O quimerismo misto foi mais freqüente nos pacientes submetidos ao condicionamento com ciclofosfamida isolada quando comparado à associação de ciclofosfamida e bussulfano.

3. A rejeição foi inversamente proporcional ao quimerismo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. YOUNG, N. S. Aplastic anemia acquired and inherited. 1<sup>st</sup> ed Philadelphia: W.B.Saunders, 1994.
2. MARY, J. Y.; BAUMELOU, E.; GUIGUET, M. Epidemiology of aplastic anemia in France: a prospective multicentric study. The French cooperative group for epidemiological study of aplastic anemia. Blood, 75:1646-1653, 1990.
3. ISSARAGRASIL, S.; KAUFMAN, D. W.; ANDERSON, T. E.; CHANSUNG, K.; THAMPRAIST, T.; SIRIJIRACHAI, J.; PIANKIJAGUM, A.; PORAKAHAM, Y.; VANNASAENG, S.; LEAVERTON, P. E.; SHAPIRO, S.; YOUNG, N. S. An association of aplastic anaemia in Thailand with low socioeconomic status. Br J Haematol, 91:80-84, 1995.
4. MALUF, E. M. C. P. A Epidemiologia da Anemia Aplástica Adquirida. Ser. Monogr. Esc. Bras. Hematolol, 7:98-110, 2000.
5. YOUNG, N. S.; ISSARAGRASIL, S.; CHICH, C. W.; TAKAKU, F. Aplastic anaemia in the Orient. Br J Haematol, 62:1-6, 1986.
6. FONG, T. P.; OKAFOR, L. A.; SCHMITZ, T. H.; THOMAS, W.; WASTERMAN, M. P. An evaluation of cellularity in various types of bone marrow specimens. Am J Clin Pathol, 72:812-816, 1979.
7. GRUPPO, R. A.; LAMPKIN, B. C.; GRANGER, S. Bone marrow cellularity determination: comparison of the biopsy, aspirate, and buffy coat. Blood, 49:29-31, 1977.
8. KEIZU, M.; ÖST, A. Diagnoses in patients with severe pancytopenia suspected of having aplastic anemia. Eur J Haematology, 45:11-14, 1990.
9. NAJEAN, Y.; PECKING, A. Prognostic factors in acquired aplastic anemia. A study of 352 cases. Am J Med, 67:564-571, 1979.
10. YOUNG, N. S.; MACIEJEWSKI, J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. N Eng J Med, 336:1365-1372, 1997.
11. MACIEJEWSKI, J.; SELLERI, C.; SATO, T.; ANDERSON, S.; YOUNG, N. S. A severe and consistent deficit in a marrow and circulating primitive hematopoietic cells (long-term culture-initiating cells) in acquired aplastic anemia. Blood, 88:1983-1991, 1996.



12. NOVITZKY, N.; JACOBS, P. Immunosuppressive therapy in bone marrow aplasia: the stroma functions normally to support hematopoiesis. Exp Hematol, 23: 1472-1477, 1995.
13. MARSH, J. C. W.; CHANG, J.; TESTA, N. G.; HOWS, J. M.; DEXTER, T. M. In vitro assessment of marrow "stem cell" and stromal cell function in aplastic anaemia. Br J Haematol., 78: 258-267, 1991.
14. SCOPES, J.; BAGNARA, M.; GORDON-SMITH, E. C.; RALL, S. E.; GIBSON, F. M. Haemopoietic progenitor cells are reduced in aplastic anemia. Br J Haematol, 86: 427-430, 1994.
15. MACIEJEWSKI, J.; ANDERSON, S.; KATEVAS, P.; YOUNG, N. S. Phenotypic and functional analysis of bone marrow progenitor cell compartment in bone marrow failure. Br J Haematol, 87:227-234, 1994.
16. NISSEN, C. The pathophysiology of aplastic anemia. Sem Haematol., 28:313-318, 1991.
17. GIBSON, F. M.; SCOPES, J.; DALY, S.; BALL, S.; GORDON-SMITH, E. C. Haemopoietic growth factor production by normal and aplastic anaemia stroma in long-term bone marrow culture. Br J Haematol, 91:551-561, 1995.
18. WODNAR-FILIPOWSKI, A.; YANCIK, S.; MOSER, Y.; DALLE CARBONARE, V.; GRATWOHL, A.; TICHELLI, A.; SPECK, B.; NISSEN, C. Levels of soluble stem cell factor in serum of patients with aplastic anemia. Blood, 81:3259-3264, 1993.
19. BACIGALUPO, A.; PIAGGIO, G.; PODESTA, M.; TONG, J.; PITTO, A.; FIGARI, O.; BENEVENUTO, F.; VASSALLO, F.; TEDONE, E.; GRASSIA, L.; VAN LINT, M. T.; GUALANDI, F.; HOFFMAN, R. Early hemopoietic progenitors in peripheral blood of patients with severe aplastic anemia (SSA) after treatment with antilymphocyte globulin (ALG), cyclosporin-A and G-CSF. Haematologica, 82:133-137, 1997.
20. PODESTÀ, M.; PIAGGIO, G.; FRASSONI, F.; PITTO, A.; MORDINI, N.; BREGANTE, S.; VALERIANI, A.; BACIGALUPO, A. Deficient reconstitution of early progenitors after allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant, 19:1011-1017, 1997.
21. \_\_\_\_\_.; PIAGGIO, G.; FRASSONI, F.; PITTO, A.; ZIKOS, P.; SESSAREGO, M.; ABATE, M.; VAN LINT, M. T.; BERISSO, G.; BACIGALUPO, A. The Assessment

- of the hematopoietic reservoir after immunosuppressive therapy or bone marrow transplantation in severe aplastic anemia. Blood, 91:1959-1965, 1998.
- 22.DOMENECH, J.; GIHANA, E.; DAYAN, A.; TRUGLIO, C.; LINASSIER, C.; DESBOIS, I.; LAMAGNERE, J.; COLOMBAT, P.; BINET, C. Hematopoiesis of transplanted patients with autologous marrows assessed by long-term marrow culture. Br J Haemat, 88:488-496, 1994.
  - 23.CALLERA, F.; FALCÃO, R. P. Increases apoptotic cells in bone marrow biopsies from patients with aplastic anaemia. Br J Haematol, 98:18-20, 1997.
  - 24.MATHÉ, G.; AMIEL, J. L.; SCHWARZEMBERG, L.; CHOAY, J.; TROLARD, P.; SCHNEIDER, M.; HAYAT, M.; SCHLUMBERGER, J. R.; JASMIN, C. Bone marrow graft in man after conditioning by antilymphocytic serum. BMJ, 2:131-136, 1970.
  - 25.CHAMPLIN, R. E.; FEIG, S. A.; SPARKES, R. S.; GALE, R. P. Bone marrow transplantation from identical twins in the treatment of aplastic anaemia: implication for the pathogenesis of the disease. Br J Haematol, 56:455-463, 1984.
  - 26.SPECK, B.; GLUCKMAN, E.; HAAK, H.L.; VAN ROOD, J. J. Treatment of aplastic anaemia by antilymphocyte globulin with and without allogeneic bone-marrow infusions. Lancet, 2:1145-1148, 1977.
  - 27.CHAMPLIN, R.; HO, W.; GALE, R. P. Antithymocyte globulin treatment in patients with aplastic anemia: a prospective randomized trial. N Engl J Med, 308:113-118, 1983.
  - 28.BACIGALUPO, A.; BROCCIA, G.; CORDA, G.; ARCESE, W.; CAROTENUTO, M.; GALLAMINI, A.; LOCATELLI, F.; MORI, P. G.; SARACCO, P.; TODESCHINI, A.; COSER, P.; IACOPINO, P.; VAN LINT, M. T.; GLUCKMAN, E. Antilymphocyte globulin, cyclosporin and granulocyte colony stimulating factor in patients with acquired severe aplastic anemia (SAA): A pilot study of the EBMT SAA Working Party. Blood, 85:1438-1353, 1995.
  - 29.LEONARD, E. M.; RAEFSKY, E.; GRIFFITH, P.; KIMBALL, J.; NIENHUIS, A. W.; YOUNG, N. S. Cyclosporine therapy of aplastic anaemia, congenital and acquired red cell aplasia. Br J Haematol, 72:278-284, 1989.
  - 30.BRODSKY, R. A.; SENSENBRENNER, L. L.; JONES, R. J. Complete remission in severe aplastic anemia after high-dose cyclophosphamide without bone marrow transplantation. Blood, 87:491-494, 1996.

31. ROSENFELD, S. J.; KIMBALL, J.; VINING, D.; YOUNG, N. S. Intensive immunosuppression with antithymocyte globulin and cyclosporine as treatment for severe acquired aplastic anemia. Blood, 85:3058-3065, 1995.
32. YOUNG, N. S.; BARRET, A. J. The treatment of severe acquired aplastic anemia. Blood, 85:3367-3377, 1995.
33. TOROK-STORB, B.; SIEFF, C.; STORB, R.; ADAMSON, J.; THOMAS, D. In vitro tests for distinguishing possible immune-mediated aplastic anemia from transfusion-induced sensitization. Blood, 55:211-215, 1980.
34. MOEBIUS, U.; HERRMANN, F.; HERCEND, T.; MEUER, S. C. Clonal analysis of CD4+/CD8+ T cells in a patient with aplastic anemia. J. Clin Invest, 87:1567-1574, 1991.
35. ZOUMBOS, N. C.; GASCÓN, P.; DJEU, J. Y.; TROST, S. R.; YOUNG, N. S. Circulating activated suppressor T lymphocytes in aplastic anemia. N Eng J Med, 312:257-265, 1985.
36. HINTERBERGER, W.; ADOLF, G.; AICHINGER, G.; DUDCZAK, R.; GEIßLER, K.; HÖCKER, P.; HUBER, C.; KALHS, P.; KNAPP, W.; KÖLLER, U.; LECHNER, K.; VOLC-PLATZER, B. Further evidence for lymphokine overproduction in severe aplastic anemia. Blood, 72:266-272, 1988.
37. SELLERI, C.; SATO, T.; ANDERSON, S.; YOUNG, N. S.; MACIEJEWSKI, J. P. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha suppress both early and late stages of hematopoiesis and induce programmed cell death. J Cell Physiol, 165:538-546, 1995.
38. NAKAO, S.; YAMAGUCHI, M.; SHIOBARA, S.; YOKOI, T.; MIYAWAKI, T.; TANIGUCHI, T.; MATSUDA, T. Interferon- $\gamma$  gene expression in unstimulated bone marrow mononuclear cells predicts a good response to cyclosporine therapy in aplastic anemia. Blood, 79:2532-2535, 1992.
39. NISTICO, A.; YOUNG, N. S. Gamma-interferon gene expression in the bone marrow of patients with aplastic anemia. Ann Intern Med, 120:463-469, 1994.
40. MACIEJEWSKI, J. P.; SELLERI, C.; ANDERSON, S.; YOUNG, N. S. Fas antigen expression on CD34+ human marrow cells is induced by interferon  $\gamma$  and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. Blood, 85:3183-3190, 1995.

41. LAVER, J.; CASTRO-MALASPINA, H.; KERMAN, N. A.; LEVICK, J.; EVANS, R. L.; O'REILLY, R. J.; MOORE, M. A. In vitro interferon-gamma production by cultured T-cells in severe aplastic anaemia: correlation with granulomonopoietic inhibition in patients who respond to anti-thymocyte globulin. Br J Haematol, 69:545-550, 1988.
42. DE PLANQUE, M. M.; BACIGALUPO, A.; WÜRSCH, A.; HOWS, J. M.; DEVERGIE, A.; FRICKHOFEN, N.; BRAND, A.; NISSEN, C. Long-term follow-up of severe aplastic anemia patients treated with anti-thymocyte globulin. Br J Haematol, 73:121-126, 1989.
43. SOCIÉ, G.; HENRY-AMAR, M.; BACIGALUPO, A. BACIGALUPO, A.; HOWS, J.; TICHELLI, A.; LJUNGMAN, P.; MCCANN, R.; FRICKHOFEN, N.; VEERKORTHOFF, E. V.; GLUCKMAN, E. Malignant tumors occurring after treatment of aplastic anemia. N Engl J Med, 329:1152-1157, 1993.
44. MARSH, J. C.; GORDON-SMITH, E. C. Treatment options in severe aplastic anaemia. Lancet, 351:1830-1831, 1998.
45. YOUNG, N. S. Autoimmunity and its treatment in aplastic anemia. Ann Int med, 126:166-168, 1997.
46. BRODSKY, R. A. Biology and management of acquired severe aplastic anemia. Curr Opin Oncol, 10:95-99, 1998.
47. ARMITAGE, J. O. Bone marrow transplantation. N Engl J Med, 330:827-838, 1994.
48. THOMAS, E. D.; STORB, R.; CLIFT, R. A. JOHNSON, A.; NEIMAN, P. E.; LERNER, K. G.; GLUCKSBERG, H.; BUCKNER, C. D. Bone-marrow transplantation. N Engl J Med, 292:832-843, 895-902, 1975.
49. \_\_\_\_; STORB, R. Technique for human marrow grafting. Blood, 36:507-515, 1970.
50. SOUILLET, G. Indications and results of progenitor cell transplant in congenital haemopathies (except Fanconi anaemia). Bone Marrow Transplant, 21:S28-S33, 1998.
51. GUARDIOLA, P.; SOCIÉ, G.; PASQUINI, R.; DOKAL, I.; ORTEGA, J. J.; VAN WEEL-SIPMAN M.; MARSH, J.; LOCATELLI, F.; SOUILLET, G.; CAHN, J. Y.; LJUNGMAN, P.; MINIERO, R.; SHAW, J.; VERMYLEN, C.; ARCHIMBAUD, E.; BEKASSY, A. N.; KRIVAN, G.; DI BARTOLOMEO, P.; BACIGALUPO, A.; GLUCKMAN, E. Allogeneic stem cell transplantation for Fanconi anaemia. Bone Marrow Transplant, 21S2:S24-S27, 1998.

52. GRATWOHL, A.; HERMANS, J.; BALDOMERO, H. Blood and marrow transplantation activity in Europe 1995. Bone Marrow Transplant, 19:407-419, 1997.
53. HINTERBERGER, W.; ROWLINGS, P. A.; HINTERBERGER-FISCHER, M.; GIBSON, J.; JACOBSEN, N.; KLEIN, J. P.; KOLB, H. J.; STEVENS, D. A.; HOROWITZ, M. M.; GALE, R. P. Results of transplanting bone marrow from genetically identical twins into patients with aplastic anemia. Ann Int Med, 126:116-122, 1997.
54. REITER, E.; KEIL, F.; BRUGGER, S.; KALHS, P.; RABITSCH, W.; HINTERBERGER, W.; FISCHER, G.; ROSENMAYR, A.; HAAS, O.; VOLC, B.; LECHNER, K.; GREINIX, H. T. Excellent long-term survival after allogeneic marrow transplantation in patients with severe aplastic anemia. Bone Marrow Transplant, 19:1191-1196, 1996.
55. HANSEN, J. A.; CLIFT, R. A.; THOMAS, E. D.; BUCKNER, C. D.; STORB, R.; GIBLETT, E. R. Transplantation of marrow from an unrelated donor to a patient with acute leukemia. N Engl J Med, 303:565-567, 1980.
56. ASH, R. C.; CASPER, J. T.; CHITAMBAR, C. R. HANSEN, R.; BUNIN, N.; TRUITT, R. L.; LAWTON, C.; MURRAY, K.; HUNTER, J.; BAXTER-LOWE, L. A.; GOTTSCHALL, J. L.; OLDHAM, K.; ANDERSON, T.; CAMITTA, B.; MENITOVE, J. Successful allogeneic transplantation of T-cell-depleted bone marrow from closely HLA-matched unrelated donors. N Engl J Med, 322:485-494, 1990.
57. BEATTY, P. G.; CLIFT, R. A.; MICKELSON, E. M. NISPEROS, B. B.; FLOURNOY, N.; MARTIN, P. J. SANDERS, J. E.; STEWART, P.; BUCKNER, C. D.; STORB, R.; THOMAS, E. D.; HANSEN, J. A. Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. N Engl J Med, 313:765-771, 1985.
58. MARGOLIS, D.; CAMITTA, B.; PIETRYGA, D.; KEEVER-TAYLOR, C.; BAXTER-LOWE, L. A.; PIERCE, K.; KUPST, M. J.; FRENCH, J. 3<sup>RD</sup>; TRUITT, R.; LAWTON, C.; MURRAY, K.; GARBRECHT, F.; FLOMENBERG, N.; CASPER, J. Unrelated donor bone marrow transplantation to treat severe aplastic anaemia in children and young adults. Br J Haematol, 94:65-72, 1996.
59. HENSLEE-DOWNEY, P. J.; ABHYANKAR, S. H.; PARRISH, R. S.; PATI, A. R.; GODDER, K. T.; NEGLIA, W. J.; GOON-JOHNSON, K. S.; GEIER, S. S.; LEE, C. G.; GEE, A. P. Use of partially mismatched related donors extends access to allogeneic marrow transplant. Blood, 89:3864-3872, 1997.

60. WAGNER, J. L.; DEEG, H. J.; SEIDEL, K.; ANASETTI, C.; DONEY, K.; SANDERS, J.; SULLIVAN, K. M.; STORB, R. Bone marrow transplantation for aplastic anemia from genotypically hla-nonidentical relatives. Transplantation, 61:54-61, 1996.
61. GROVAS, A.; FEIG, S. A.; O'ROURKE, S.; VALENTINO, L.; WILEY, F.; HUNT, L.; LANDAW, E. M.; GAJEWSKI, J. Unrelated donor bone marrow transplants in children. Cell Transplant, 3:413-420, 1994.
62. STORB, R. Bone Marrow transplantation for aplastic anemia. Cell transplant., 2:365, 1994.
63. CAMITTA, B. M.; THOMAS, E. D.; NATHAN, D. G.; SANTOS, G.; GORDON-SMITH, E. C.; GALE, R. P.; RAPPEPORT, J. M.; STORB, R. Severe aplastic anemia: a prospective study of the effect of early marrow transplantation on acute mortality. Blood, 48:63-70, 1976.
64. GLUCKMAN, E.; SOCIE, G.; DEVERGIE, A.; BOURDEAU-ESPEROU, H.; TRAINEAU, R.; COSSET, J. M. Bone marrow transplantation in 107 patients with severe aplastic anemia using cyclophosphamide and thoraco-abdominal irradiation for conditioning: long-term follow-up. Blood, 78:2451-2455, 1991.
65. DEEG, H. J.; LEISENRING, W.; STORB, R.; NIMS, J.; FLOWERS, M. E.; WITHERSPOON, R. P.; SANDERS, J.; SULLIVAN, K. M. Long-term outcome after marrow transplantation for severe aplastic anemia. Blood, 91:3637-3645, 1998.
66. GLUCKMAN, E.; HOROWITZ, M. M.; CHAMPLIN, R. E.; HOWS, J. M.; BACIGALUPO, A.; BIGGS, J. C.; CAMITTA, B. M.; GALE, R. P.; GORDON-SMITH, E. C.; MARMONT, A. M. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: influence of conditioning and graft-versus-host disease prophylaxis regimens on outcome. Blood, 79:269-275, 1992.
67. DEEG, H. J.; SELF, S.; STORB, R.; DONEY, K.; APPELBAUM, F. R.; WITHERSPOON, R. P.; SULLIVAN, K. M.; SHEEHAN, K.; SANDERS, J.; MICKELSON, E.; THOMAS, E. D. Decrease incidence of marrow graft rejection in patients with severe aplastic anemia: changing impact of risk factors. Blood, 68:1363-1368, 1986.
68. PASSWEG, J. E.; SOCIE, G.; HINTERBERGER, W.; BACIGALUPO, A.; BIGGS, J.; CAMITTA, B. M.; CHAMPLIN, R. E.; GALE, R. P.; GLUCKMAN, E.; GORDON-SMITH, E. C.; HOWS, J. M.; KLEIN, J. P.; NUGENT, M. L.; PASQUINI, R.; ROWLINGS, P. A.; SPECK, B.; TICHELLI, A.; ZHANG, M.; HOROWITZ, M. M.;

- BORTIN, M. Bone marrow transplantation for severe aplastic anemia has outcome improved?. Blood, 90:858-864, 1997.
69. DUELL, T.; VAN LINT, M. T.; LJUNGMAN, P.; TICHELLI, A.; SOCIÉ, G.; APPERLEY, J.; WEISS, M.; COHEN, A.; NEKOLLA, E.; KOLB, H. Health and functional status of long-term survivors of bone marrow transplantation. Ann Intern Med, 126:184-192, 1997.
70. DONEY, K.; LEISENRING, W.; STORB, R.; APPELBAUM, F. R. Primary treatment of acquired aplastic anemia: outcomes with bone marrow transplantation and immunosuppressive therapy. Ann Intern Med, 126:107-115, 1997.
71. PASQUINI, R. Transplante de medula óssea na anemia aplástica severa: estudo em 108 pacientes. Curitiba, 1991. Tese (Concurso de Professor Titular) - Departamento de Clínica Médica Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
72. SULLIVAN, K. M. Longterm followup and quality of life after hematopoietic stem cell transplantation. J Rheumatol, 24:46-52, 1997.
73. DAVIES, S. M.; WAGNER, J. E.; DEFOR, T.; BLAZAR, B. R.; KATSANIS, E.; KERSEY, J. H.; ORCHARD, P. J.; MCGLAVE, P. B.; WEISDORF, D. J.; RAMSAY, K. C. Unrelated donor bone marrow transplantation for children and adolescents with aplastic anaemia or myelodysplasia. Br J Haematol, 96:749-756, 1997.
74. STORB, R.; THOMAS, E. D.; BUCKNER, C. D.; CLIFT, R. A.; DEEG, H. J.; FEFER, A.; GOODWELL, B. W.; SALE, G. E.; SANDERS, J. E.; SINGER, J.; STEWART, P.; WEIDEN, P. L. Marrow transplantation in thirty "untransfused" patients with severe aplastic anemia. Ann Intern Med, 92:30-36, 1980.
75. CHAMPLIN, R. E.; HOROWITZ, M. M.; VAN BEKKUM, D. W.; CAMITTA, B. M.; ELFENBEIN, G. E.; GALE, R. P.; GLUCKMAN, E.; GOOD, R. A.; RIMM, A. A.; ROZMAN, C.; SPECK, B.; BORTIN, M. M. Graft failure bone marrow transplantation for severe aplastic anemia: risk factors and treatment results. Blood, 73:606-613, 1989.
76. KILLICK, S. B.; WIN, N.; MARSH, J. C. W.; KAYE, T.; YANDLE, A.; HUMPHRIES, C.; KNOWLES, S. M.; GORDON-SMITH, E. C. Pilot study of HLA alloimmunization after transfusion with pre-storage leucodepleted blood products in aplastic anaemia. Br J Haematol, 97:677-684, 1997.

77. BACIGALUPO, A.; PIAGGIO, G.; PODESTA, M.; FIGARI, O.; BENEVENUTO, F.; SOGNO, G.; TEDONE, E.; RAFFO, M. R.; GRASSIA, L.; FERRERO, R.; VAN LINT, M. T.; GUALANDI, F. Influence of marrow CFU-GM content on engraftment and survival after allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant, 15:221-226, 1995.
78. CAMITTA, B. M.; THOMAS, E. D.; NATHAN, D. G.; GALE, R. P.; KOPECKY, K. J.; RAPPEPORT, J. M.; SANTOS, G.; GORDON-SMITH, E. C.; STORB, R. A prospective study of androgens and bone marrow transplantation for treatment of severe aplastic anemia. Blood, 53:504-514, 1979.
79. PLATANIAS, L.; GASCON, P.; BIELORY, L.; GRIFFITH, P.; NIENHUIS, A. W.; YOUNG, N. S. Lymphocyte phenotype and lymphokines following anti-thymocyte globulin therapy in patients with aplastic anemia. Br J Haematol, 66:437-443, 1987.
80. TERAMURA, M.; KOBAYASHI, S.; IWABE, K.; YOSHINAGA, K.; MIZOGUSHI, H. Mechanism of action of antithymocyte globulin in the treatment of aplastic anaemia: in vitro evidence for the presence of immunosuppressive mechanism. Br J Haematol, 96:80-84, 1997.
81. SCHREZENMEIER, H.; SCHLANDER, M.; RAGHAVACHAR, A. Cyclosporin A in aplastic anemia - Report of a workshop. Ann Hematol, 65:33-36, 1992.
82. FONSECA, R.; TEFFERI, A. Practical aspects in the diagnosis and management of aplastic anemia. Am J Med Sci, 313:159-169, 1997.
83. GLUCKMAN, E.; ESPEROU-BOURDEAU, H.; BARUCHEL, A.; BOOGAERTS, M.; BRIERE, J.; DONADIO, D.; LEVERGER, G.; LEPORRIER, M.; REIFFERS, J.; JANVIER, M. Multicenter randomized study comparing cyclosporine-A alone and antithymocyte globulin with prednisone for treatment of severe aplastic anemia. Blood, 79:2540-2546, 1992.
84. FRICKHOFEN, N.; KALTWASSER, J. P.; SCHREZENMEIER, H.; RAGHAVACHAR, A.; VOGT, F.; HERRMANN, F.; FREUND, M.; MEUSERS, P.; SALAMA, A.; HEIMPEL, H. Treatment of aplastic anemia with antithymocyte globulin and methylprednisolone with or without cyclosporine. N. Engl J. Med, 324:1297-1304, 1991.
85. MATLOUB, Y. H.; SMITH, C.; BOSTROM, B.; KOERPER, M. A.; O'LEARY, M.; KHUDER, S.; SMITHSON, W. A.; NICKERSON, H. J.; SILBERMAN, T.; HILDEN,



- J.; MOERTEL, C. L.; MONTH, S.; MONTELEONE, P.; RAMSAY, N. K. C. One course versus two courses of antithymocyte globulin for the treatment of severe aplastic anemia in children. J Pediatr Hematol Oncol, 19:110-114, 1997.
86. SHAO, Z.; CHU, Y.; ZHANG, Y.; CHEN, G.; ZHENG, Y. Treatment of severe aplastic anemia with an immunosuppressive agent plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and erythropoietin. Am J Hematol, 59:185-191, 1998.
87. CRUMP, M.; LARRATT, L. M.; MAKI, E.; CURTIS, J. E.; MINDEN, M. D.; MEHARCHAND, J.; LIMPTON, J. H.; MESSNER, H. A. Treatment of adults with severe aplastic anemia: primary therapy with antithymocyte globulin (ATG) and rescue of ATG failures with bone marrow transplantation. Am J Med, 92:596-602, 1992.
88. BACIGALUPO, A.; HOWS, J.; GLUCKMAN, E. NISEN, C.; MARSH, J.; VAN LINT, M. T.; CONGIU, M.; DE PLANQUE, M. M.; ERNST, P.; MCCANN, S. Bone marrow transplantation (BMT) versus immunosuppression for the treatment of severe aplastic anaemia (SAA): A report of EBMT SAA working party. Br J Haematol, 70:177-182, 1988.
89. TSAI, T.; FREYTES, C. Allogeneic bone marrow transplantation for leukemias and aplastic anemia. Adv Int Med, 42:423-451, 1997.
90. WARE, R. E.; HALL, S. E.; ROSSE, W. F. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with onset in childhood and adolescence. N Engl J Med, 325:991-996, 1991.
91. TICHELLI, A.; GRATWOHL, A.; WÜRSCH, A.; NISSEN, C.; SPECK, B.; Late haematological complications in severe aplastic anaemia. Br J Haematol, 69:413-418, 1988.
92. OHARA, A.; KOJIMA, S.; HAMAJIMA, N.; TSUCHIDA, M.; IMASHUKU, S.; OHTA, S.; SASAKI, H.; OKAMURA, J.; SUJITA, K.; KIGASAWA, H.; KIRIYAMA, Y.; AKATSUKA, J.; TSUKIMOTO, I. Myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia as a late clonal complication in children with acquired aplastic anemia. Blood, 90:1009-1013, 1997.
93. VANKAMP, H.; LANDEGENT, J. E.; JANSSEN, R. P. M.; WILLEMZE, R.; FIBBE, W. E. Clonal hematopoiesis in patients with acquired aplastic anemia. Blood, 78:3209-3214, 1991.

94. YOUNG, N. S. The problem of clonality in aplastic anemia: Dr Dameshek's riddle, restated. Blood, 79:1385-1392, 1992.
95. WHITE, J. R.; JOSTEN, K. M.; CHOPRA, R.; TOOZE, J.; SASO, R.; GORDON-SMITH, E. C; RUTHERFORD, T. R. Absence of N-RAS point mutations in peripheral blood cells of patients with aplastic anemia and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. Br J Haematol, 91:921-923, 1993.
96. SOCIE, F.; HENRY-AMAR, M.; BACIGALUPO, A.; HOWS, J. TICHELLI, A.; LJUNGMAN, P.; MCCANN, S. R.; FRICKHOFEN, N.; VAN'T VEER-KORTHOFF, E.; GLUCKMAN, E. Malignant tumors occurring after treatment of aplastic anemia. European bone marrow transplantation - severe aplastic anaemia working party. N Engl J Med, 329:1152-1157, 1993.
97. LAWLOR, E. R.; ANDERSON, R. A.; DAVIS, J. H.; FRYER, C. H.; PRITCHARD, S. L.; ROGERS, P. C. J.; WU, J. K.; SCHULTZ, K. R. Immunosuppressive therapy: a potential alternative to bone marrow transplantation as initial therapy for acquired severe aplastic anemia in childhood?. J Ped Hematol Oncol, 19:115-123, 1997.
98. TICHELLI, A.; PASSWEG, J.; NISSEN, C. BARGETZI, M.; HOFFMANN, T.; WODNAR-FILIPOWICZ, A.; SIGNER, E.; SPECK, B.; GRATWOHL, A. Repeated treatment with horse antilymphocyte globulin for severe aplastic anaemia. Br J Haematol, 100:393-400, 1998.
99. BESSHO, M.; HIRASHIMA, K.; ASANO, S.; IKEDA, Y.; OGAWA, N.; TOMONAGA, M.; TOYAMA, K.; NAKAHATA, T.; NOMURA, T.; MIZOGUCHI, H.; YOSHIDA, Y.; NIITSU, Y.; KOHGO, Y. Treatment of anemia of aplastic anemia patients with recombinant human erythropoietin in combination with granulocyte colony-stimulating factor: a multicenter controlled study. Eur J Haematol, 58:265-272, 1997.
100. YASUI, M.; PARK, Y. D.; OKAMURA, T.; CHAYAMA, K.; YOSHIMOTO, T.; INOUE, M.; YAGI, K.; KAWA, K. CD34<sup>+</sup> progenitor cell transplantation from two HLA-mismatched healthy fathers to two infants with severe aplastic anemia. Int J Hematol, 67:15-22, 1998.
101. UGOZZOLI, L.; YAM, P.; PETZ, L. D.; FERRARA, G. B.; CHAMPLIN, R.E. FORMAN, S. J.; KOYAL, D.; WALLACE, R. B. Amplification by the polymerase chain reaction of hypervariable regions of the human genome for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation. Blood, 77:1607-1615, 1991.

102. HILL, R. S.; PETERSEN, F. B.; STORB, R.; APPELBAUM, F. R.; DONEY, K.; DAHLBERG, S.; RAMBERG, R.; THOMAS, E.D. Mixed hematologic chimerism after bone marrow transplantation for severe aplastic anemia associated with a high risk of graft rejection and a lessened incidence of acute graft-versus-host disease. Blood, 67:811-816, 1986.
103. MANGIONI, S.; BALDUZZI, A.; RIVOLTA, A.; ROVELLI, A.; NESI, F.; ROSSI, V.; BUSCA, A.; UDERZO, C.; MINIERO, R.; BIONDI, A. Long-term persistence of hemopoietic chimerism following sex-mismatched bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplantation, 20:969-973, 1997.
104. LO, Y. M. D.; NOAKES, L.; JEANNET, M.; CHAPUIS, B.; FLEMMING, K. A.; WAINSCOT, J. S. Application of a polymorphic Y microsatellite to the detection of post bone marrow transplantation chimerism. Br J Haematol, 89:645-649, 1995.
105. FRANKEL, W.; CHAN, A.; CORRINGHAM, R. E.; SHEPHERD, S.; REARDEN, A.; WANG-RODRIGUEZ, J.; Detection of chimerism and early engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation by short tandem repeats. Am J Hematol, 52:281-287, 1996.
106. JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L.. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. Nature, 314:67-73, 1985.
107. THEIN, S. L.; JEFFREYS, A. J.; BLACKLOCK, H. A. Identification of post-transplant cell population by DNA fingerprint analysis (letter). Lancet, 2:37, 1986.
108. OBERKIRCHER, A. R.; STROUT, M. P.; HERZIG, G. P.; FRITZ, P. D.; CALIGIURI, M. A. Description of an efficient and highly informative method for the evaluation of hematopoietic chimerism following allogeneic bone marrow transplantation. Bone marrow Transplant, 16:695-702, 1995.
109. MARTINELLI, G.; TRABETTI, E.; FARABEGOLI, P.; TESTONI, N.; BANDINI, G.; MOTTA, M. R.; VITTONI, A.; TERRAGNA, C.; PIGNATTI, P. F. Early detection of bone marrow engraftment by amplification of hypervariable DNA regions. Hematologica, 82:156-160, 1997.
110. DIEZ-MARTIN, J. L.; LLAMAS, P.; GOSALVEZ, J.; LOPEZ-FERNANDEZ, C.; POLO, N.; DE LA FUENTE, M. S.; BUNO, I. Conventional cytogenetics and FISH evaluation of chimerism after Sex-mismatched bone marrow transplantation (BMT) and donor leucocyte infusion (DLI). Haematologica, 83:408-415, 1998.

111. JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; NEUMANN, R.; KEYTE, J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: Towards DNA fingerprinting of single cells. Nucleic Acids Res, 16:10953-71, 1988.
112. HORN, G. T.; RICHARDS, B.; KLINGER, K. W. Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res, 17:2140, 1989.
113. CASADO, L. F.; STEEGMANN, J. L.; PICÓ, M.; REQUENA, M. J.; RAMIREZ, M.; MADERO, L.; VICARIO, J. L.; ALEGRE, A.; GOMEZ, C.; FERNÁNDEZ-RAÑADA, J. M.; Study of chimerism in long-term survivors after bone marrow transplantation for severe acquired aplastic anemia. Bone Marrow Transplant, 18:405-409, 1996.
114. BADER, P.; HÖLLE, W.; KLINGEBIEL, T.; HANDGRETINGER, R.; BENDA, N.; SCHLEGEL, P. G.; NIETHAMMER, D.; BECK, J. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. Bone Marrow Transplant, 19:697-702, 1997.
115. \_\_\_\_; BECK, J.; FREY, A.; SCHLEGEL, P. G.; HEBARTH, H.; HANDGRETINGER, R.; EINSELE, H.; NIEMEYER, C.; BENDA, N.; FAUL, C.; KANZ, D.; NIETHAMMER, D.; KLINGEBIEL, T. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. Bone Marrow Transplant, 21:487-495, 1998.
116. TERRITO, M. C.; For the UCLA Bone Marrow Transplantation Team: Autologous bone marrow repopulation following high dose cyclophosphamide and allogeneic marrow transplantation in aplastic anemia. Br. J. Haematol, 36:305-308, 1977
117. LAWLER, M.; HUMPHRIES, P.; MCCANN, S. R. Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction. Blood, 77:2504-2514, 1991.
118. HUSS, R.; DEEG, H. J.; GOOLEY, T.; BRYANT, E.; LEISENRING, W.; CLIFT, R.; BUCKNER, C. D.; MARTIN, P.; STORB, R.; APPELBAUM, F. R. Effect of mixed chimerism on graft-versus-host disease, disease recurrence and survival after HLA-

- identical marrow transplantation for aplastic anemia or chronic myelogenous leukemia. Bone Marrow Transplant, 18:767-776, 1996.
119. ROY, D. C.; TANTRAVAH, R.; MURRAY, C.; DEAR, K.; GORGONE, B.; ANDERSON, K. C.; FREEDMAN, A. S.; NADLER, L. M.; RITZ, J. Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation with CD6-depleted allogeneic marrow: a stable equilibrium. Blood, 75:296-304, 1990.
  120. BERTHEAS, M. F.; LAFAGE, M.; LEVY, P.; BLAISE, D.; STOPPA, A. M.; VIENS, P.; MANNONI, P.; MARANINCHI, D. Influence of mixed chimerism on results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. Blood, 78:3103-3106, 1991.
  121. YAM, P. Y.; PETZ, L. D.; KNOWLTON, R. G.; WALLACE, R. B.; STOCK, D.; LANGE, G.; BROWN, V.; DONIS-KELLER, H.; BLUME, K. Use of DNA restriction fragment length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplants. Transplantation, 43:399-407, 1987.
  122. MATTSSON, J.; UZUNEL, M.; REMBERGER, M.; RINGDEN, O.; T cell mixed chimerism is significantly correlated to a decrease acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. Transplantation, 71:433-439, 2001.
  123. KEABLE, H.; BOURHIS, J. H.; BRISON, °; LEHN, P.; SCHENMETZLER, C.; DEVERGIE, A.; GLUCKMAN, E. Long-term of chimerism in bone marrow transplantation recipients for severe aplastic anaemia. Br J Haematol, 71:525-533, 1989.
  124. GOMEZ, J. R.; GARCIA, M. J.; SERRANO, J.; SANCHEZ, J.; FALCON, M.; CASTILLEJO, J. A.; NAVARRO, J. A.; MARTIN, C.; TORRES, A. Chimerism analysis in long-term survivor patients after bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. Haematologica, 82:588-591, 1997.
  125. FISHLEDER, A. J.; BOLWELL, B.; LICHTIN, A. E. Incidence of mixed chimerism using bussulfan/cyclophosphamide containing regimens in allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant, 9:293-297, 1992.
  126. ROY, D. C.; TANTRAVAH, R. MURRAY, C.; DEAR, K.; GORGONE, B.; ANDERSON, K. C.; FREEDMAN, A. S.; NADLER, L. M.; RITZ, J. Natural history of mixed chimerism after bone marrow transplantation after bone marrow

- transplantation with CD6 depleted allogeneic marrow: A stable equilibrium. Blood, 75:296-300, 1990.
127. ANDREANI, M.; MANNA, M.; LUCARELLI, G.; TONUCCI, P.; AGOSTINELLI, F.; RIPALTI, M.; RAPA, S.; TELEVI, N.; GALIMBERTI, M.; NESCI, S. Persistence of mixed chimerism in patients transplanted for the treatment of talassemia. Blood, 87:3494-3499, 1996.
128. RAPANOTTI, M. C.; ARCESE, W.; BUFFOLINO, S.; IORI, A. P.; MENGARELLI, A.; DE CUIA, M. R.; CARDILLO, A.; CIMINO, G. Sequential molecular monitoring of chimerism in chronic myeloid leukemia patients receiving donor lymphocyte transfusion for relapse after bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant, 19:703-707, 1997.
129. GARDINER, N.; LAWLER, M.; O'RIORDAN, J.; DEARCE, M.; HUMPHRIES, P.; MCCANN, S. R. Persistent donor chimaerism is consistent with disease-free survival following BMT for chronic myeloid leukaemia. Bone Marrow Transplant, 20:235-241, 1997.
130. MACKINNON, S.; BARNETT, L.; HELLER, G.; O'REILLY, R. J. Minimal residual disease is more common in patients who have mixed T-cell chimerism after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukaemia. Blood, 83:3409-3416, 1994.
131. SCHATTEMBERG, A.; DE WITTE, T.; SALDEN, M.; VET, J.; VAN DIJK, B.; SMMETS, D.; HOOGENHOUT, J.; HAANEN, C. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. Blood, 73:1367-1372, 1989.
132. VAN LEEWEN, J. E. M.; VAN TOL, M. J. D.; JOOSTEN, A. M.; WIJNEM, J. T.; VERWEIJ, P. J. M.; MEERA KHAN, P.; VOSSEN, J. M. Persistence of host-type hematopoiesis after alogenic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but it is not associated with an increase risk of relapse. Blood, 83:3059-3067, 1994.
133. WILBORN, F.; SCHMIDT, C. A.; SIEGERT, W. Demonstration of chimerism after bone marrow transplantation by polymerase chain reaction of Y-chromosome-specific nucleotide sequences-characterization of a new technical approach. Leukemia, 7:140-143, 1993.

134. PETZ, L. D.; YAM, P.; WALLACE, R. B.; STOCK, A. D.; DE LANGE, G.; KNOWLTON, R. G.; BROWN, V. A. ; DONIS-KELLER, H.; HILL, L. R.; FORMAN, S. J. Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies. Blood, 70:1331-1337, 1987.
135. TANAKA, J.; KANSAY, M.; HIGA, T.; KOBAYASHI, S.; HASHINO, S.; SAKURADA, K.; MIYAZAKI, T. Evaluation of mixed chimerism by two-step polymerase chain reaction amplification of hypervariable region MCT118 after allogeneic bone marrow transplantation. Ann Hematol, 68:189-93, 1994.
136. ELMAAGACLI, A. H.; BEELEN, D. W.; BECKS, H. W.; MOBASSCHER, A.; STOCKOVA, J.; TRZENSKY, S.; OPALKA, B. Molecular studies of chimerism and residual disease after allogeneic peripheral blood progenitor cell or bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant, 18:397-403, 1996.
137. AMOS, D. B.; BASHIR, H.; BAYLE, W.; MC QUEN, M.; TIILIKAINER, A. A simple microcytotoxicity test. Transplantation, 7:220-222, 1969.
138. FERRARA, J. L. M.; DEEG, H. J. Graft-versus-host disease. N Engl J. Med, 324:667-674, 1991.
139. WILLIAMS, D. L.; HARRIS, A.; WILLIAMS, K. J.; BROSIUS, M. J.; LEMONDS, W. A direct bone marrow chromosome technique for acute lymphoblastic leukemia. Cancer Genet Cytogenet, 13:239-257, 1984.
140. SCHERES, J. M. Human chromosome banding. Lancet, 1:849, 1972.
141. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed., New York: Cold spring harbor, University press, 1982.
142. MACFARLAND, C. Chimerism analysis procedure. Clinical immunogenetics laboratories Fred Hutchinson Cancer Research Center: Seattle, 1994.
143. SAJANTILA, A.; LUKKA, M. Improved separation of PCR amplified VNTR alleles by a vertical polyacrylamide gel electrophoresis. Int J Legal Med, 105:355-359, 1993.
144. SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 29:487-491, 1988.
145. GAIL, M. H.; BRINTON, L. A.; BYAR, D. P. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. J. Natl. Cancer Inst. 85:1879-1886, 1989.